

**Untersuchung zur Wechselwirkung zwischen
Phosphoinositid 3-Kinase und Ras**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)**

**Vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Claudia Borgholte (geb. Mayer)
geboren am 08.10.1973 in Winnenden**

Gutachter

- 1. Prof. R. Wetzker**
- 2. PD Dr. K. Friedrich**
- 3. Prof. Ch. Englert**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 05.12.2006

Meiner Tochter Annico.

Abkürzungsverzeichnis

$\alpha 1$ – AdrR	$\alpha 1$ – adrenerger Rezeptor
cAmp	zyclisches Adenosinmonophosphat
cGmp	zyclisches Guanosinmonophosphat
cPLA ₂ -Rez	zytoplasmatischer Phospholipase A ₂ Rezeptor
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor (epidermal growth factor)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GAP	GTPase aktivierendes Protein (GTPase activating protein)
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guaninnukleotidaustauschfaktor (guaninnucleotide exchange factor)
GGTase	Geranylgeranyltransferase
GPCR	G-protein gekoppelter Rezeptor (g-protein coupled receptor)
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathione S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
Icmt	Isoprenylcystein-Carboxylmethyltransferase
JNK	c-Jun NH ₂ terminale Kinase
kDa	Kilo Dalton
LPA	Lysophosphatsäure (lysophosphatidic acid)
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase (mitogen-activated protein kinase)
mRas	posttranslational modifiziertes Ras
NGF	nervaler Wachstumsfaktor (nerve growth factor)
n-OG	n-Octylglucosid
PDGF	“platelet derived growth factor”
PE	Phenylephrin
PI-PLC	Phosphoinositid-Phospholipase C
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3-Phosphat
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PKC- α	Proteinkinase C- α
PtdIns	Phosphatidylinositol
Ras-GRF	Guaninnukleotid Lösungsfaktor
RBD	Ras-bindende Domäne
Rce1	Ras und A-Faktor umwandelndes Enzym (Ras and a-factor converting

	enzyme)
RT	Raumtemperatur
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS-Page	diskontinuierliche Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (discontinuous sodium – dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
uRas	posttranslational unmodifiziertes Ras
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	Seite 5
2 Einleitung	
2.1 Die Signalvermittlung zwischen den Zellen	Seite 7
2.2 Die Ras-Superfamilie	Seite 8
2.3 Die Struktur der Ras-Proteine	Seite 9
2.4 Ras-Effektoren	Seite 15
2.5 Phosphoinositid 3-Kinasen	Seite 22
2.6 Die Verbindung zwischen Phosphoinositid 3-Kinasen und Ras	Seite 26
2.7 Malignes Wachstum durch Ras	Seite 29
3 Ziele der Arbeit	Seite 34
4 Materialien und Methoden	
4.1 Materialien	Seite 35
4.2 Methoden	Seite 41
5 Ergebnisse	
5.1 Aufreinigung von modifiziertem Ras	Seite 48
5.2 Untersuchungen zur Ras-Bindungsstelle an p110 γ	Seite 53
5.3 Modifiziertes Ras bindet an p110 γ in einer GTP- und GDP-abhängigen Weise	Seite 55
5.4 p110 γ -Aktivität wird durch Ras nicht gesteigert	Seite 56
5.5 PI3K γ mobilisiert Ras nicht aus der Membran	Seite 58
5.6 mRas mobilisiert PI3K γ nicht an die Zellmembran	Seite 59
5.7 Farnesylierung wird für die Ras-Bindung an p110 γ benötigt	Seite 60
5.8 EDTA beeinflusst die Ras-Modifizierung und die mRas- Bindung an p110 γ	Seite 63

6 Diskussion	Seite 65
7 Schlussfolgerungen	Seite 80
8 Literaturverzeichnis	Seite 82
9 Anhang	Seite 107

1 Zusammenfassung

Das GTP-hydrolysierende Protein Ras ist das Produkt eines Proto-Onkogens, das in 20-30% aller menschlichen Tumoren mutiert vorkommt. Es bindet GDP/GTP mit hoher Affinität und weist in Gegenwart von GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) eine hohe GTP-Hydrolyse-Aktivität auf. Das proto-onkogene „normale“ Ras fungiert als regulierter molekularer Schalter in Signaltransduktionswegen, die u.a. Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Apoptose beeinflussen. Ras wechselt dabei zwischen zwei Zuständen, in denen es entweder GTP gebunden hat (aktiv) oder das GTP zu GDP hydrolysiert ist (inaktiv). Charakteristisch für das Ras-Protein ist die posttranslationale Modifizierung des Carboxy-terminalen Endes CAAX. Dabei durchläuft das Protein eine Farnesylierung, eine Abspaltung von 3 Aminosäuren (AAX), eine Methylierung und, je nach Ras-Spezies, ein bis zwei Palmitoylierungen. Durch die Modifizierung kann das zunächst zytosolische Ras an die Zellmembran verankert werden. Zu den zahlreichen Effektoren des Ras gehören unter anderem auch die Phosphoinositid 3-Kinasen, von denen verschiedene Isoformen ($\alpha/\beta/\gamma/\delta$) existieren. Sie bestehen aus einer katalytischen Untereinheit p110 und einer Regulatoruntereinheit p85, lediglich von der p110 γ war zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine Regulatoreinheit bekannt. Es gilt als erwiesen, dass PI3K α und β einen Komplex mit Ras-GTP bilden, was zu einer Steigerung der Kinaseaktivität (Phosphorylierung eines Inositolringes von Phosphoinositiden in Position D3) führt. Die Ras-Bindungsstelle für p110 α ist AS 133-314. In dieser Arbeit sollte die Wechselwirkung des Ras mit der PI3K γ Isoform untersucht werden. Auf welche Weise reagiert Ras in Abhängigkeit von seiner Nukleotidbeladung mit PI3K γ ? Und welche Rolle spielt dabei die posttranslationale Modifizierung des Ras (mRas)?

Zunächst musste das Ras-Protein aufgereinigt werden. Auf der Grundlage eines Protokolls von Page (Page, MJ, 1989) wurden verschiedene Arbeitsschritte beleuchtet und optimiert. Die p110 γ wurde als GST-Fusionsprotein aufgereinigt. Es erfolgten *in vitro*-Bindungsversuche in Abhängigkeit unterschiedlicher Nukleotidbeladung, bzw. Modifizierungsgrade des Ras. Durch verschiedene p110 γ -Deletionsmutanten wurde die Ras-Bindungsstelle bestimmt. Eine Steigerung der PI3K γ -Aktivität durch Ras-GTP wurde durch die Zugabe von Phosphatidylinositol und $\gamma^{32}\text{p}$ -ATP mit anschließender Cerenkov Zählung untersucht. Eine weitere Interaktionsmöglichkeit bestand darin, membrangebundenes mRas durch p110 γ in

das Cytosol zu mobilisieren, oder umgekehrt, cytosolische p110 γ an die Zellmembran zu rekrutieren. Auch dazu wurden *in vitro* - Versuche durchgeführt. Durch verschiedene Inhibitoren der Ras-Modifizierung sollte der Einfluss des Modifizierungsgrades auf die PI3K γ -Bindung beleuchtet werden. Ebenso wurde der Einfluss von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionenentzug durch EGTA, bzw. EDTA untersucht. Folgende Ergebnisse ließen sich festhalten:

1. Durch Optimierung der Aufreinigungsprozedur wurden reinere und stärker konzentrierte (bis zu 6,8 mg/ml) Ras Präparate erreicht.
2. Im Gegensatz zu p110 α , das unabhängig von der posttranslationalen Modifikation nur Ras-GTP bindet, bindet p110 γ nur unmodifiziertes Ras in GTP-Abhängigkeit. mRas bindet sowohl in GTP-, als auch in GDP-gebundenen Zustand an p110 γ .
3. Die Ras-Bindungsstelle liegt zwischen AS 98-740 von p110 γ .
4. Die p110 γ -Kinaseaktivität wird durch Bindung an Ras nicht gesteigert.
5. Eine Membranrekrutierung der Kinase durch Ras wurde nicht gefunden. Ebenso keine Mobilisierung von mRas in das Cytosol durch p110 γ .
6. Eine Komplexbildung zwischen p110 γ und Ras findet überwiegend nach der Ras-Farnesylierung statt. Außerdem fiel eine vermehrte Bindung von mRas an p110 γ unter EDTA-Einfluß auf, also unter Entzug von Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen.

Wir schlussfolgern aus der Tatsache, dass die Ras-Bindungsstelle der p110 γ weit mehr AS umfasst als bei der α - und β -Isoform, und dass die Farnesylierung eine Schlüsselrolle in der Komplexbildung einnimmt, die Existenz einer zweiten Bindungsstelle, die lediglich das modifizierte Ras besitzt. Somit wäre die erhöhte Bindungskapazität von mRas gegenüber uRas erklärt, ebenso, weshalb der Ras-GTP/p110 γ Komplex weniger empfindlich auf GAP's reagiert als der Komplex mit uRas. Anders als bei der α - und β -Isoform wird die Kinaseaktivität bei der Komplexbildung *in vitro* nicht gesteigert. Möglicherweise werden dazu zusätzliche Regulatorproteine benötigt. Eine Membranrekrutierung der Kinase durch Ras, wie es bereits für Raf-1 bekannt ist, konnte nicht bewiesen werden. Umgekehrt wurde auch keine Membranlösung von mRas durch die Komplexbildung beobachtet. Nach diesen Ergebnissen besteht die Aufgabe der p110 γ in der Regulation des Aktivitätsstatus von Ras, indem es stabile Komplexe bildet und Ras vor GAP Proteinen schützt.

2 Einleitung

2.1 Die Signalvermittlung zwischen den Zellen

Die Regulation des Zellwachstums gehört zu den wichtigsten physiologischen Vorgängen aller Lebewesen. Hierzu stehen den einzelnen Zellarten zahlreiche spezifische Faktoren als Signal für Start und Ende der Zellteilung zur Verfügung. Wachstumsfaktoren und Hormone stimulieren das Zellwachstum, indem sie als Signalmoleküle die zum Wachstum und Überleben notwendigen Prozesse der Zellen stimulieren. Dabei kann die Wirkungsvermittlung auf zwei grundsätzlich verschiedenen Wegen erfolgen: durch die neuronale Kommunikation, die sich im Sekundenbereich bewegt, und durch die humorale Kommunikation, die in der Regel Minuten, Stunden oder länger benötigt. Bei Letztgenannter unterscheidet man wiederum zwei Möglichkeiten:

- a) Die Substanz beeinflusst die Genaktivität indem sie die Zellmembran durchdringt und an einen intrazellulären spezifischen Rezeptor gebunden wird. Nach diesem Prinzip wirken zum Beispiel die Steroidhormone oder das Thyroxin.
- b) Diejenigen Faktoren oder Hormone, die nicht die Zellmembran durchdringen können, müssen ihre intrazelluläre Wirkung durch einen membranständigen Rezeptor vermitteln. Zum Beispiel vermittelt Insulin und verschiedene Wachstumsfaktoren ihre Wirkung derart, dass der Rezeptor gemeinsam mit dem gebundenen Effektor per Endozytose aufgenommen wird. Intrazellulär erfolgt ein lysosomaler Abbau. Neurotransmitter können durch die Effektorbindung steuerbare Ionenkanäle öffnen oder schließen. Andere Substanzen wiederum aktivieren durch die Rezeptor-Effektorbindung ein so genanntes „second messenger System“. Als Second messenger werden Kleinmoleküle bezeichnet, die ein extrazelluläres Signal in Stoffwechseländerungen der Zielzelle umsetzen. Als Botenstoffe sind zum Beispiel G-Proteine, cAmp, cGmp, Diacylglycerin, Arachidonsäure und Inositol bekannt. Diese Botenstoffe verursachen einen Verstärkungseffekt und machen es möglich, dass völlig verschiedene (teils synergistische, teils antagonistische) Wirkungen auf die gleiche oder verschiedenen Zellen ausgelöst werden können. Ähnlich einem second

messenger System ist das Ras-Protein, das hier näher untersucht werden sollte, in einen Weg der Signalübertragung von extrazellulär nach intrazellulär beteiligt.

2.2 Die Ras-Superfamilie

Eine Säugetierzelle enthält etwa hundert verschiedene GTP-bindende Proteine. Diese sind an der Regulation von vielen biologischen Prozessen (Proteinbiosynthese, transmembranäre Transportprozesse, Übertragung von Signalen aus dem Extra- in den Intrazellularraum, etc.) beteiligt.

Die GTP-bindenden Proteine der Ras-Superfamilie sind monomere G-Proteine und haben ein Molekulargewicht von 20 –30 kDa. Sie sind in der Lage sowohl GTP (aktiver Zustand) als auch GDP (inaktiver Zustand) zu binden (Bhattacharya, M, 2004).

Die Ras-Superfamilie wurde zunächst in drei Hauptgruppen unterteilt: ras, rho und rab (Downward, J,1990). Weitere Familien (arf, sar, ran, rad und rag) wurden entdeckt (Wittinghofer, A, 1996). Heute wird die Ras-Superfamilie, auch Superfamilie der kleinen G-Proteine genannt, in fünf Unterfamilien unterschieden: Ras-GTPasen, Rho-GTPasen, Arf-GTPasen, Rab-GTPasen und Ran-GTPase (Bhattacharya, M, 2004). Die meisten dieser Familien können in weitere Unterfamilien unterteilt werden (Ausnahme: Ran).

Die Ras – Familie ist beteiligt an der Regulation von Signalkaskaden der Zellen bezüglich der Gentranskription. Rho – Familie GTPasen funktionieren als Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts und können ebenfalls die Gentranskription beeinflussen. Rab und Arf kontrollieren die Formation, Fusion und Bewegung des vesikulären Verkehrs zwischen verschiedenen Zellmembrankompartimenten. Und Ran-GTPase reguliert sowohl die microtubuläre Organisation und den nukleozytoplasmatischen Proteintransport (Bhattacharya, M, 2004).

2.3 Die Struktur der Ras-Proteine

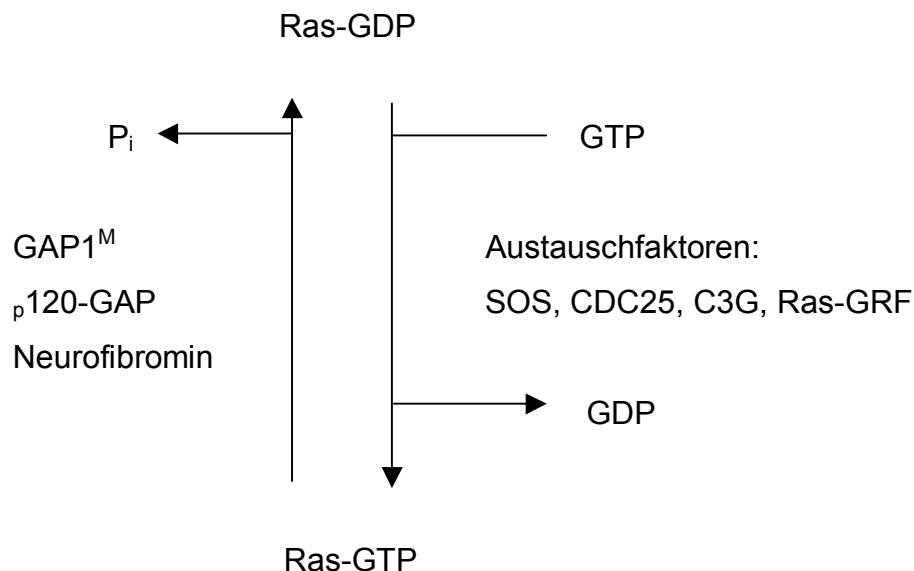
Eine große Anzahl neuer Daten wurde gewonnen durch Studien mit Ras-Mutanten und durch die Röntgenkristallographie, die mit einer Auflösung bis zu 1,35 Angström durchgeführt wurde (Schlichting, I, 1990) (Milburn, MV, 1990). Es zeigte sich, dass die erhaltenen Sequenzabschnitte der Ras-verwandten Proteine an einem Guaninnukleotidaustausch beteiligt sind (Bhattacharya, M, 2004) und dass die so genannte G-Domäne, die miteinbezogen ist in die Bindung und Hydrolyse von GTP, ebenso in anderen GTP-bindenden Proteine wie EF-TU und E α gefunden wurde.

Das Ras-Protein zirkuliert also zwischen einer GDP-gebundenen, inaktiven Form und einer GTP-gebundenen, aktiven Form (Abb.1).

Der Austausch des GDP mit GTP, also die Aktivierung des Proteins, wird katalysiert durch die Guaninnukleotidaustauschfaktoren, die eine Dissoziation des GDP vom Protein bewirken. Da in der Zelle die GTP-Konzentration ca. 50-fach höher ist als die GDP-Konzentration, wird anschließend mehrheitlich GTP an das Ras gebunden. Zu diesen Ras-Nukleotidaustauschfaktoren (GEF = Guaninnukleotid exchange factor) gehören zum Beispiel Ras-GRF (Ras Guaninnucleotid release factor) in Säugetieren, Sos in *Drosophila melanogaster* und Säugetieren, sowie Cdc25 und Sdc25 in *Saccharomyces cerevisiae* (Boguski, MS, 1993). Die aktive GTP-gebundene Form konvertiert durch die geringe intrinsische GTPase Aktivität des Ras zurück in die GDP-gebundene inaktive Form. Dabei handelt es sich um eine hydrolytische Spaltung (Schlichting, I, 1990). Dieser Prozess wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt. Nachgewiesen wurden GAPs in humanen Zellen (Neurofibromin, p120GAP) (Bollag, G, 1991) (Martin, GA, 1990), in *Drosophila melanogaster* (GAP1), in *Saccharomyces cerevisiae* (Ira1, Ira2, Bud2) und in *S. pombe* (Sar1/gap1) (Boguski, MS, 1993). Die durch die GTP-Bindung verursachte Konformationsänderung ermöglicht es Ras mit seinen Effektoren zu reagieren.

Abb.1: Aktivierung des Ras durch Nukleotidaustausch

Das Ras-Protein zirkuliert zwischen einer GDP-gebundenen, inaktiven Form und einer GTP-gebundenen aktiven Form. Die Dissoziation des Proteins von GDP und Bindung an GTP wird dabei durch GEF's bewirkt. Die GAP's dagegen steigern die GTPase-Aktivität und damit die hydrolytische Spaltung von GTP in GDP.



Die Regionen der Konformationsänderung wurden Switch 1 (AS 30 –38) und Switch 2 (AS 60 – 76) genannt. Switch 1 überlappt sich mit der so genannten Effektorregion (AS 32 – 40) und ist Teil der L2 Schleife und des $\beta 2 \beta$ - Abschnittes. Switch 2 ist eine sehr mobile Region und existiert in vielen Konformationszuständen (Wittinghofer, A, 1996) (Milburn, MV, 1990).

Charakteristisch für das Ras-Protein ist die posttranslationale Modifizierung des Carboxy-terminalen Endes CAAX (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure, bei Ras häufig Serin oder Threonin), das in fast allen Proteinen der Ras-Superfamilie gefunden wird, ebenso wie in vielen anderen membranassoziierten Proteinen (z. Bsp. CGMP Phosphodiesterase, nukleäres Lamin A und B, α - und γ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine) (enthalten in Hancock, J F, 1990). Das CAAX-Motiv liegt unmittelbar C-terminal der

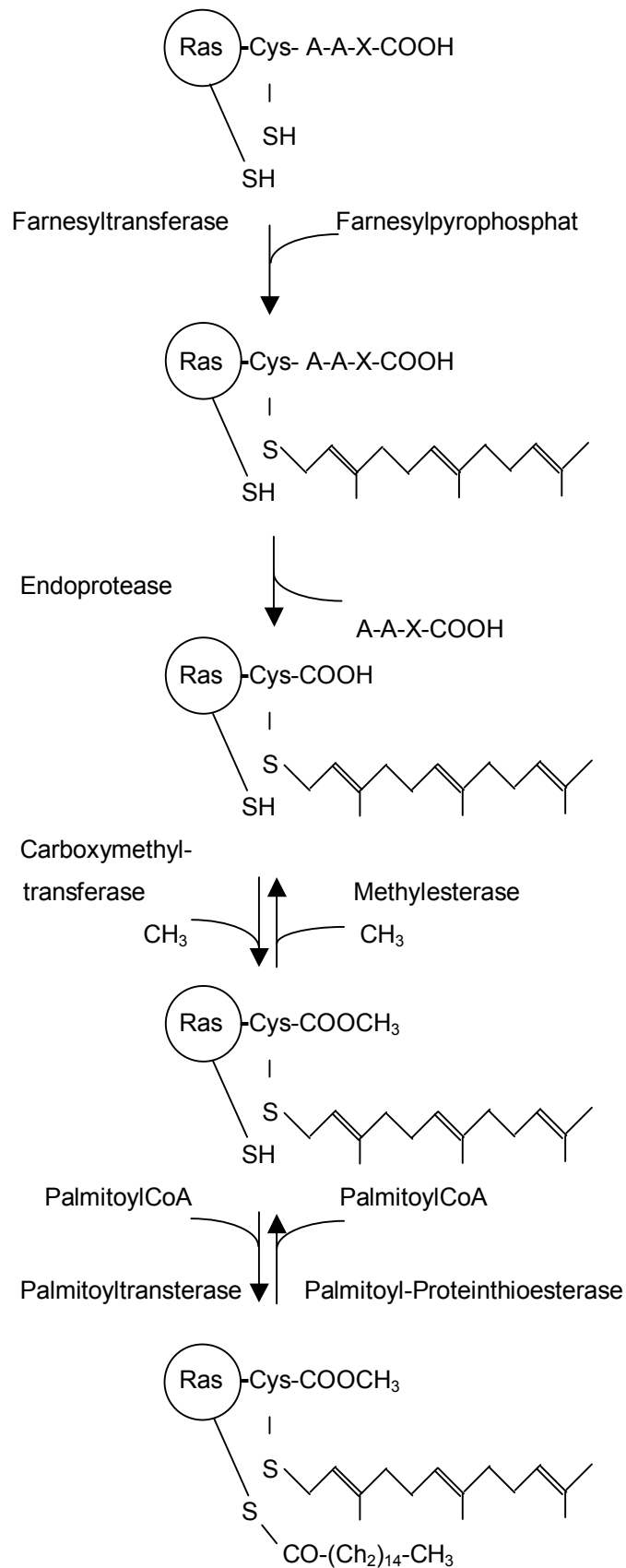
hypervariablen Domäne, eine Region von 20 AS, wodurch sich die verschiedenen Isoformen der Ras-Proteine voneinander unterscheiden und somit wohl auch unter anderem die unterschiedlichen biologischen Effekte der Isoformen begründet sind (Hancock, JF, 2003). Die Modifizierung beginnt mit einer Farnesylierung des Cysteins (Cys 186) im CAAX-Motiv, katalysiert durch Farnesyltransferasen (s. Abb.2) (Gutierrez, L, 1989). Die Farnesylgruppe wird aus dem Mevalonat-Cholesterol-Syntheseweg bereitgestellt. Auch die anderen GTPasen der Ras-Superfamilie durchlaufen einen ähnlichen Weg der posttranslationalen Modifizierung, doch wird eine andere der drei Prenyltransferasen verwendet. Typ-I-Geranylgeranyltransferase (GGTase-I) erkennt ebenso ein CAAX-Motiv, bevorzugt aber ein Leucin in der X-Position. Zu ihren Substraten gehören Mitglieder der Rho/Rac- und Rap-Familie. Typ-II-GGTase erkennt die für Rab-Proteine typischen carboxyterminalen Motive der Form Cys-X-Cys oder Cys-Cys (Boguski, MS, 1993) (Glomset, JA, et al., 1990).

Daraufhin werden die drei letzten Aminosäuren proteolytisch abgespalten. Das nahe Carboxylende wird carboxymethyliert (Gutierrez, L, 1989) (Hrcycyna, CA, 1991). Der vierte und letzte Schritt besteht aus einer Palmitoylierung von Cysteinen (Cys 181 und 184) innerhalb der hypervariablen Region (AS 165 – 185) (enthalten in Hancock, JF, 1990). Das K-Ras (B), geformt durch alternatives Splicen, besitzt diese Cysteine nicht und kann folglich auch nicht palmitoyliert werden (Gutierrez, L, 1989) (Hancock, JF, 1990) (Hrcycyna, CA, 1991).

Stattdessen enthält seine hypervariable Domäne eine polybasische Domäne von sechs Lysinresten (AS 175 – 180), die sich für die Membranbindung von K-Ras (B) als essentiell erwies. Ähnliche polybasische Motive aus Lysinresten oder einer Kombination von Lysin- und Argininresten wurden auch in anderen Ras-verwandten Proteinen gefunden: Rap1a, Rap1b, RhoA, RhoC und Ral (Hancock, JF, 1989). Sie werden nicht nur zur Plasmalokalisation verwendet, sondern auch als nukleäres Translokationssignal, allerdings liegt dann die Domäne nicht C-terminal in Nähe des CAAX-Motivs, sondern zentral im Körper des Proteins, zum Beispiel beim nukleären Lamin (Loewinger, L, 1988).

Abb.2: Die Modifizierung des Ras (Hancock, JF, 1990 und 2003)

In fast allen Proteinen der Ras-Superfamilie ist das CAAX-Motiv enthalten, das durch eine Reihe posttranslationaler Modifizierungen verändert wird.



Der Prozess der posttranslationalen Modifizierung von Ras-Proteinen der Säugetiere beginnt zunächst im Cytosol durch die Farnesyltransferase und wird dann auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Reticulums (ER) durch die Enzyme Rce1 (Ras and a-factor converting enzyme) und Icmt (Isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase) fortgesetzt (Kim, E, 1999) (Otto, JC, 1999) (Hrycyna, CA, 1991) (Dai, Q, 1998). Dabei wird das K-Ras stärker methyliert als das H-Ras oder N-Ras, allerdings ist unklar, weshalb dies der Fall ist (Choy, E, 1999). Anschließend nehmen die Ras-Proteine einen von zwei möglichen Wegen Richtung Plasmamembran, das Erkennungssignal hierfür scheint aminoterminal der farnesylierten Cysteine zu liegen (Hancock, JF, 1990) (Hancock, JF, 1991).

K-Ras verlässt das ER und gelangt über einen bis jetzt kaum beschriebenen Weg an die Plasmamembran. H-Ras und N-Ras werden am ER farnesyliert und gelangen durch den klassischen Sekretionsweg über den Golgi-Apparat an die Plasmamembran (Hancock, JF, 1990) (Choy, E, 1999) (Apolloni, A, 2000) (Hancock, JF, 2003). Die korrekte Modifizierung des CAAX-Motivs spielt für den weiteren Transport an die Zellmembran eine wichtige Rolle, denn die Deletion von Rce1 oder Icmt führt zu einer Lokalisierung des Ras im Cytosol (Bergo, MO, 2000) (Bergo, MO, 2001) (Bergo, MO, 2002). Ras-Mutanten, die nicht modifiziert werden können, oder Ras-Proteine, deren Modifizierung durch Compactin gehemmt wurde, können also nicht an die Zellmembranen binden und sie zeigen auch keine biologische Aktivität. Man folgert daraus, dass die Bindung an Membranen eine wichtige Rolle hat in der Vermittlung der biologischen Funktion des Ras (Jackson, JH, 1990) (Hancock, JF, 1990). Auch scheint das Ras die Aufgabe zu besitzen andere Enzyme zu ihren Substraten an der Zellmembran zu führen (Marshall, CJ, 1994) (Leevers, SJ, 1994) (Stokoe, D, 1994).

Das Modell der Mikrostruktur einer Plasmamembran hat sich in den letzten Jahren sehr verändert. Früher galt die Plasmamembran als eine uniforme Lipiddoppelschicht, ein sog. Bilayer. Heute weiß man, dass es sich um ein Mosaik aus verschiedenen Mikrodomänen (sogn. Lipid rafts) handelt (Simons, K, 2000).

Für die Lokalisation des Ras innerhalb einer Zelle scheinen die Modifizierungsgrade eine wichtige Rolle zu spielen. Jeder einzelne Schritt erhöht seine Affinität zur Zellmembran. Sowohl die Farnesylgruppe, als auch die Palmitoylgruppe erhöhen die Lipophilie und auch die Methylgruppe scheint in einem gewissen Sinn das Protein lipophiler erscheinen zu lassen, indem sie an die negativ geladene

Carboxylgruppe gebunden wird (Gutierrez, L, 1989) (Hancock, JF, 1989) (Hrcycyna, CA, 1991). Generell gilt, dass palmitoylierte periphere Membranproteine gut in die Struktur von so genannten lipid rafts passen, während ungesättigte, verzweigte Prenylketten nicht gut hineinpassen. Lipid rafts nennt man einen in einer weniger geordneten Umgebung mit mehr ungesättigten Fettsäuren wie ein Floß schwimmenden Bereich in einer der beiden Lipidschichten der Zellmembran, in dem Proteine, Cholesterol und meist ungesättigte und daher geradkettige Lipide besonders dicht und geordnet gepackt sind. Sie scheinen unter anderem an Prozessen der Signalübertragung und des Vesikeltransports beteiligt zu sein (Foster, LJ, 2003).

Während die Farnesylierung und die Proteolyse in den Zellen irreversibel sind, können die Methylierung und Palmitoylierung rückgängig gemacht werden (Abb.2) (Rubio, I, 1997) (Baker, TL, 2000). Noch ist unklar, wo in der Zelle die Depalmitoylierung erfolgt, welche Thioesterase dafür verantwortliche ist und wie das Ras-Protein dann einer erneuten Palmitoylierung zugeführt werden kann. Jedenfalls stellt die Regulation der Ras-Palmitoylierung einen interessanten Weg der Beeinflussung der Ras-Lokalisation in der Zelle und damit auch der Signalvermittlung dar.

Bezüglich der Ras-Lokalisation in der Zelle gibt es auch Unterschiede zwischen den einzelnen Isoformen. Es wird ein Modell postuliert, wonach K-Ras außerhalb der lipid rafts liegt, währen H-Ras in GDP-gebundener Form zum Teil in lipid rafts lokalisiert ist (in GTP-gebundener Form jedoch nicht), also ein Ortswechsel je nach Aktivierungsgrad stattfindet. (Prior, IA, 2001A) (Chen, X, 2001) (Prior, IA, 2001B).

2.4 Ras-Effektoren

Die Effektoren des Ras wurden dadurch definiert, dass sie wesentlich stärker mit der GTP-gebundenen Form, also der aktiven Form des Ras, reagieren als mit der GDP-gebundenen, inaktiven Form. Diese Reaktion des Effektors mit dem Ras wird limitiert durch die Hydrolyse des proteingebundenen GTP zu GDP (Boguski, MS, 1993).

Viele extrazellulären Stimuli führten zu einer Ras-Aktivierung: Phorbol ester, T-Zell-Rezeptoragonisten, CD2 Antikörper und Interleukin 2 in T-Lymphozyten (Downward, J, 1990a) (Sato, T, 1991), Interleukin-3, Granulozyten-Makrophagen Kolonien-Stimulierender Faktor und Steel Faktor in Mastzellen (Duronio, V, 1992) (Sato, T, 1991), Erythropoetin in Erythroleukämischen Zellen (Torti, M, 1992), EGF und NGF in PC12 Zellen (Muroya, K, 1992) (Qiu, MS, 1991), PDGF, EGF und Insulin in verschiedenen Fibroblasten (Burgering, BMT, 1991) (Gibbs, JB, 1990).

Viele Effektorproteine sind bis heute entdeckt worden (Marshall, CJ, 1996). Zu den Bekanntesten zählen sicherlich die Raf-Proteine. Diese Protoonkogene codieren Serin-Threonin-Kinasen, die die MAPK (auch bekannt als ERK) aktivieren (Marshall, CJ, 1994) (Daum, G, 1994). Das Ras bindet an die Regulatorregion der Serin-Threonin-Kinase in einer GTP-abhängigen Weise (Wittinghofer, A, 1995). Diese Regulatorregion wird auch als Ras-bindende-Domäne (RBD) bezeichnet und liegt im Bereich der Aminosäuren 51 – 131 (humanes Raf1) (Emerson, SD, 1995) (Nassar, N, 1995). Die Affinität des Raf zur GTP-, bzw. GDP-gebundenen Form unterscheidet sich um den Faktor 10^3 (Herrmann, C, 1995). Es wird allgemein angenommen, dass die vorrangige Rolle des Ras in der Aktivierung durch Translokation des zytoplasmatischen Raf1 in einem Komplex mit 14-3-3 an die Plasmamembran besteht (Kolch, W, 2000). Denn es zeigte sich, dass für die Komplexbildung zwischen Ras und Raf die posttranslationale Modifizierung nicht nötig ist, es kann aber keine Aktivierung des Raf nachgewiesen werden (Kikuchi, A, 1994). Wird dagegen eine membranverankerte Version von Raf, Raf-CAAX, in Zellen expremiert, kommt es in membrangebundener Form vor und ist enzymatisch aktiv, unabhängig von der Aktivierung durch Ras (Leevers, SJ, 1994) (Stokoe, D, 1994) (Hall, A, 1994). Chieko *et al.* bewiesen dagegen, dass die Ras-Raf1-Bindung, abgesehen von der Membranrekrutierung, auch für die Raf1-Aktivierung eine wichtige Rolle spielt (Chieko, M, 1997). Abgesehen davon scheinen Tyrosinkinasen

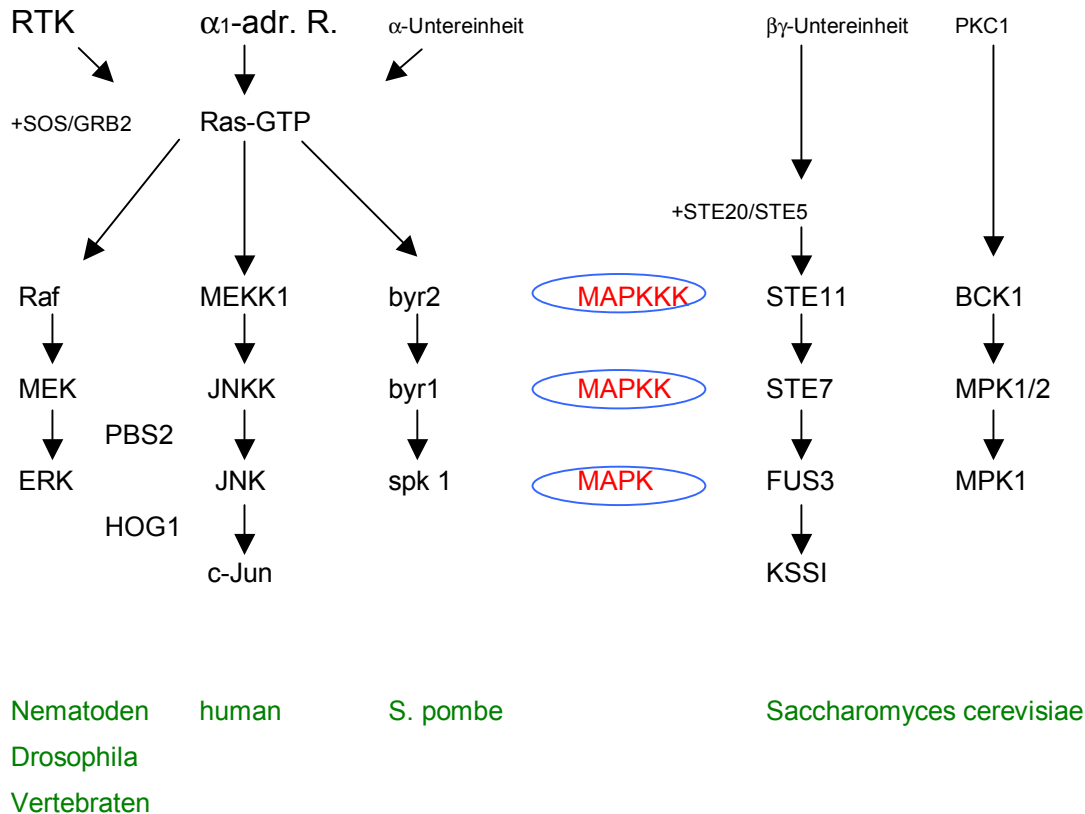
und/oder Serinthreoninkinasen bei der Aktivierung von Raf beteiligt zu sein (Williams, N, 1992) (Marshall, CJ, 1994) (Daum, G, 1994). In der Tat wiesen Zhang *et al.* nach, dass eine Phosphorylierung von Thr598 und Ser 601, gelegen zwischen Subdomäne VII und VIII und von *Caenorhabditis elegans* bis zu Säugetieren in allen Raf-Familienmitgliedern enthalten, für die B-Raf-Aktivierung durch Ras benötigt wird (Zhang, BH, 2000). Für die Raf1-Aktivierung spielt eine Dephosphorylierung vom Serin 259, sowie eine Phosphorylierung von Serin 338 und Tyrosin 341 eine Rolle (Mason, CS, 1999) (Jaumot, M, 2001) (Kubicek, M, 2002).

Seit bekannt ist, dass die ProteinkinaseC- α (PKC- α) in der Lage ist Raf-1 zu phosphorylieren und aktivieren, gilt sie als möglicher zusätzlicher Faktor in der MAPK-Signalübertragung (Kolch, W, 1993).

Das aktivierte Raf stellt eine MAPKKK dar und phosphoryliert Mek (MAPKK) (Kyriakis, J, 1992) (Howe, LR, 1992) (Dent, P, 1992) (Van Aelst, I, 1993). Mek wiederum phosphoryliert MAPK (ERK), die daraufhin in den Zellkern verlagert wird (Marshall, CJ, 1994) (Daum, G, 1994) (Zieger, M, 2000) (Abb.3). Die aktivierte MAPK phosphoryliert dann eine Anzahl von zytoplasmatischen und nukleären Effektoren, die an der Proliferation von Zellen beteiligt sind, so zum Beispiel Ser/Thrkinasen wie 3p-Kinase, MAPKAP-Kinase-2 (p90_{rsk}), Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, c-Myc, c-Jun, c-Fos, ATF-2 und Strukturproteine wie Talin, MAPs oder Lamin (Daum, G, 1994) (Lin, TA, 1994) (Van Putten, V, 2000) (Smith, CC, 2000) (Ramstad, C, 2000). Aber auch Rezeptoren stellen Effektoren der MAPK dar, obwohl die Funktion der Phosphorylierung von EGF-Rezeptoren und cPLA₂-Rezeptoren (cytoplasmic phospholipase A₂) noch unklar ist (Davis, RJ, 1993). Außerdem spielt der Raf-MAPK-Signalweg eine wichtige Rolle bei der Fibroblastenproliferation (Cowley, S, 1994).

Abb.3: Wege der Signalübertragung durch MAPK.

Vereinfachte schematische Darstellung von MAPK-Signalkaskaden in verschiedenen Spezies. Mit ihrer Hilfe werden extrazelluläre Informationen in den Zellkern getragen.



Auch ERK1 und ERK2 sind in der Lage c-Raf-1 zu phosphorylieren, allerdings ohne Aktivierung der Kinaseaktivität. Eine mögliche Funktion dieses Feedbacks könnte die Lösung des aktivierten Raf von der Zellmembran sein. Jedenfalls wurde nachgewiesen, dass das Raf, einmal an die Membran rekrutiert, dort nicht für längere Zeit verweilt (Stokoe, D, 1994)

Inzwischen kennt man auch Ras-Mutanten, die die MAPK vom Zytosol aus aktivieren (Cadwallader, KA, 1994). Aber auch ein Ras-unabhängiger MAPK Signalweg wurde in humanen NK-Zellen nachgewiesen (Wei, S, 2000). Am aminoterminalen Ende des Raf1 wurde außerdem noch eine zweite Ras-bindende

Domäne entdeckt, eine Cystein-reiche Domäne (AS 139-184), die in die Ras-vermittelte Raf-Aktivierung miteinbezogen ist (Brtva, TR, 1995) (Fabian, JR, 1994). Ähnlich diesem Modell der Proteinkinasen existieren mehrere weitere Signalkaskaden dieser Art (Cano, E, 1995).

So wird offenbar durch ein ähnliches Modell der Effekt des α_1 -adrenergen Rezeptors (α_1 -AdrR) auf die JNK (c-Jun NH₂-terminale Kinase) vermittelt: die durch Ras-GTP aktivierte MAPKKK (Russell, M, 1995) (Lange-Carter, CA, 1994) aktiviert die JNKK (JNK Kinase), die wiederum die JNK phosphoryliert und aktiviert. JNK phosphoryliert dann c-Jun, das mit c-Fos einen Komplex bildet und zu einer AP-1-abhängigen Gentranskription führt (Karin, M, 1995) (Smith, CC, 2000). Dieser Effekt kann zur *in vitro* und *in vivo* Hypertrophie des Herzens führen (Ramirez, MT, 1997). Für die PE-stimulierte kardiale Hypertrophie (PE stimuliert die Genexpression durch den Raf-MEK-ERK-Signalweg) (Thorburn, J, 1994) (Gillespie-Brown, J, 1995) (Bogoyevitch, MA, 1996) spielt zusätzlich die MEKK-JNK-Signalkaskade eine Rolle, denn während eine konstitutiv aktivierte Variante des Raf eine ANF-Expression induziert, zeigt die dominant negative Mutante keine Inhibition der PE-induzierten ANF-Expression (Ramirez, MT, 1997).

Eine weitere Ras-abhängige MAPK-Signalkaskade wurde in *S. pombe* entdeckt, wobei die α -Untereinheit eines G-Proteins Ras-abhängig byr2 als MAPKKK aktiviert. Diese aktiviert schließlich über byr1 spk1 (Abb.3) (Marshall, CJ, 1994) (Chang, EC, 1994). Andere Signalübertragungen gleichen Modells wurden auch in *S. cerevisiae* entdeckt, allerdings gibt es bis jetzt keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Ras-Proteins (Marshall, CJ, 1994).

Inzwischen weiß man, dass die MAPK-Signalkaskade über mindestens zwei Wege aktiviert werden kann. Zum einen über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie zum Beispiel dem EGF-Rezeptor: seine Stimulierung durch EGF führt zu dessen Autophosphorylierung und es bildet sich ein Multiproteinkomplex, der aus dem phosphorylierten Rezeptor, dem Phosphoprotein Shc, dem Adaptorprotein Grb 2 und dem Ras-GTP-Ausstauschfaktor Sos besteht. Die Komplexbildung kommt durch die SH2-Domäne (Src homologe Domäne) des Grb 2, die vermutlich an die Autophosphorylierungsstelle Y1068 des EGF-Rezeptors bindet, und durch seine SH3-Domäne, die vermutlich an die carboxyterminale Domäne des Sos bindet, zustande. Das cytosolische Sos wird somit an die Zellmembran, wo sich sein Substrat, das Ras, befindet, herangebracht. Durch den Nukleotidaustausch entsteht

Ras-GTP, das dann Raf aktiviert (Buday, L, 1993) (Ravichandran, KS, 1995) (Schlessinger, J, 1993). Auch nicht rezeptorgebundene Tyrosinkinasen können Ras durch eine direkte oder indirekte Phosphorylierung des Adapterproteins Shc, das den Grb 2-Sos 1-Komplex bindet, aktivieren (Boguski, MS, 1993).

Zum anderen kann die MAPK-Signalkaskade aktiviert werden durch GPCRs (G-Protein coupled receptor): hierbei vermitteln die $\beta\gamma$ - Untereinheiten Ras-abhängig eine Aktivierung der MAPK-Signalkaskade (Bhattacharya, M, 2004) (Marinissen, MJ, 2001) (Takai, Y, 2002), zum Beispiel ausgelöst durch Stimulation des LPA-Rezeptors (lysophosphatidic acid) und des α_{2a} adrenergen Rezeptors (Koch, WJ, 1994). Es folgt ebenfalls eine Shc-Phosphorylierung, Shc-Grb2-Assoziation und Sos-Aktivierung. Hier scheint auch die PI3K beteiligt zu sein, einzuordnen oberhalb des Sos (Hawes, BE, 1996). Neben der klassischen second messenger-Kaskade kann die MAPK Aktivierung auch aus der Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen durch GPCRs resultieren (Luttrell, LM, 2002) (Bhattacharya, M, 2004).

Die MAPK-Signalkaskade kann aber auch Ras-unabhängig durch LPA-Rezeptoren und PDGF-Rezeptoren in MC3T3-E1-Zellen aktiviert werden (Caverzasio, J, 2000). Gleichfalls scheint ein derartiger Ras-unabhängiger Signalweg auch in humanen NK-Zellen zu existieren (Wei, S, 2000).

Neben der Aktivierung durch Rekrutierung an die Plasmamembran gibt es noch zwei weitere Möglichkeiten durch die Ras-GTP die Aktivität seiner Effektoren beeinflussen kann. Bei PI3K erhöht es deren katalytische Aktivität durch eine Konformationsänderung, ohne dass eine Membranlokalisation des Ras nötig wäre (Pacold, ME, 2000). Durch die Membranrekrutierung kann Ras-GTP aber auch den Effektor zu dessen Substrat bringen wie es bei Ral-GDS oder Scd1 (und eventuell bei PI3K) der Fall ist (Marshall, CJ, 1996).

Ral-GDS, eine Familie von Austauschfaktoren für die Ras-verwandten Ral-Proteine reagieren in einem Zwei-Hybriden-System in Hefezellen mit aktiviertem Ras (Bhattacharya, M, 2004). Über die Funktion des Ral selbst ist bis jetzt wenig bekannt. Möglicherweise wird es in die Regulation der Phospholipase D miteinbezogen. Ral-GDS inhibiert das GTPase-aktivierende NF1 und die Interaktion mit Raf durch Besetzung des Effektorbindungsplatzes auf dem Ras ohne die Nukleotidbindung zu beeinflussen (Kikuchi, A, 1994) (Spaargaren, M, 1994). Eine andere Studie zeigte eine Regulation der Ral-GDS- und Ral-Aktivität durch Ras-

GTP. (Urano, T, 1996). An der Ras-abhängigen c-Jun-Phosphorylierung durch JNKK und JNK scheint die RalGEF-Ral Signalübertragung ebenfalls beteiligt zu sein (Carey, KD, 2000). Es wurde deutlich, dass die Mitglieder der Ras-Superfamilie ein kompliziertes Netzwerk an GTPase-Signalwegen bilden. Nicht nur, dass der Ras-GTPase-Weg den Ral-GTPase-Zyklus beeinflussen kann, auch umgekehrt findet eine Beeinflussung statt: Aktiviertes RalA steigert die transformierende Aktivität des Ras und des Raf (Urano, T, 1996). Der Ral-GTPase-Zyklus kann auch den GTPase-Signalweg von CDC42 beeinflussen (Cantor, SC, 1995). Auch kann der CDC42 Signalweg durch seinen Nukleotidaustauschfaktor Scd1 durch das Ras beeinflusst werden (Chang, EC, 1994). Außerdem steht das Ras (durch p120-GAP) mit Mitgliedern der Rho-Familie über den Ras-GAP-Bindungspartner p190 Rho-GAP in Verbindung (Settleman, J, 1992) (Khosravi – Far, R, 1995) (Boguski, MS, 1993). Auch Ras-GEFs wie Ras-GRF und SOS besitzen Austauschdomänen für Rho-Familienmitglieder (Feig, LA, 1994). Inzwischen wurden multiple Interaktionen zwischen Ras und den Rho-, Rac- und CDC42-Signalwegen nachgewiesen (Nobes, CD, 1995) (Li, G, 1997). Offensichtlich ist dieses komplizierte Netzwerk an GTPasen für die Koordination unterschiedlicher Zellantworten nötig.

Ebenfalls wichtig für die Generierung unterschiedlicher Signale der doch so homologen Ras-Isoformen ist sicherlich auch die unterschiedliche Lokalisation in der Zelle, bzw. in der Plasmamembran. Denn wenn sich die Ras-Mikrodomänen in der Konzentration von Cofaktoren oder in den Substraten der Ras-Effektoren unterscheiden, dann ist auch das entstehende Signal jeweils unterschiedlich (Van Laethem, F, 2002) (Hancock, JF, 2003). So verursachen die beiden nahezu homologen Proteine H-Ras und K-Ras *in vivo* unterschiedliche Prozesse, obwohl sie *in vitro* an die gleichen Effektoren binden (gleiche Effektor-bindende Domäne). K-Ras aktiviert *in vivo* stärker Raf-1, H-Ras aktiviert vor allem Phosphoinositid 3-Kinasen (Parton, RG, 2004). Diese Unterschiede sind durch die hypervariable Domäne verursacht, die durch eine unterschiedliche posttranslationale Modifizierung zu unterschiedlichen Lokalisationen an den Subdomänen der Plasmamembran führt: GDP-H-Ras reagiert zum Beispiel mit lipid rafts und Caveolen, während GTP-H-Ras oder K-Ras dies nicht tun (Matallanas, D, 2003) (Prior, IA, 2001A) (Niv, H, 2002) (Prior, IA, 2003) (Jaumot, M, 2002). K-Ras ist überwiegend an der ungeordneten Plasmamembran lokalisiert, verankert durch eine polybasische Sequenz und Farnesylierung. Das aktivierte K-Ras rekrutiert und

aktiviert Raf an der Plasmamembran vollständig. Zusammen werden sie endozytiert. Anschließend wird das Raf an das Cytosol freigegeben und K-Ras diffundiert zurück an die Plasmamembran. Ist H-Ras aktiviert, rekrutiert es ebenfalls Raf an die Plasmamembran, kann die Raf-Aktivierung jedoch nur initiieren. Die Vollendung erfolgt durch Endozytose derselben. Auch hier gelangt Raf danach in das Cytosol, H-Ras verbleibt im Endosom und wird per Endozytose zurück zur Plasmamembran gebracht (Roy, S, 2002)

Chiu et al. zeigten, dass membrangebundenes wt H-Ras, stimuliert durch EGF, zunächst Raf an die Plasmamembran rekrutiert und dann an den Golgi-Apparat, also zu einer anhaltenden Ras-Aktivierung an Golgi-Membranen führt (Chiu, VK, 2002) (Howe, CL, 2001) (Rizzo, MA, 2000). Dies tritt auf durch Endozytose des aktivierten EGF-Rezeptors und membrangebundenes H-Ras, und auch durch Fusion von Endosomen, die EGF-Rezeptoren enthalten, mit Endosomen, die H-Ras enthalten (Jiang, X, 2002). In den Ras-positiven Endosomen fand sich GFP-Raf nach EGF- oder Insulin-Stimulation (Jiang, X, 2002) (Rizzo, MA, 2001). Es gibt weitere Hinweise, dass aktiviertes Ras an Endomembranen auch Effektoren aktivieren kann (Hancock, JF, 2003).

Auch Insulin-Stimulation führt zu einer Internalisierung von GFP-H-Ras von der Plasmamembran in Endosomen (Jiang, X, 2002) (Rizzo, MA, 2001). Mittlerweile sind mehrere Wachstumsfaktoren bekannt, die den Weg der Endozytose gehen um den Raf-Mek-ERK-Signalweg zu aktivieren (Sorkin, A, 2002).

Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt gehören zu den Ras-Effektoren auch die Ras-GTPase aktivierende Proteine, wie p120-GAP, Neurofibromin und GAP1 (Marshall, CJ, 1996) (Trahey, M, 1988). Hierbei handelt es sich um negative Effektoren. 1990 wiesen Martin *et al.* nach, dass das Neurofibromatose Typ 1 Protein (NF 1) eine GAP-verwandte Domäne besitzt, die in der Lage ist die Ras-Funktion zu mindern. Möglicherweise führt der Verlust dieser Funktion durch die gesteigerte Ras-Aktivität zu einer abnormalen zellulären Proliferation und somit zu den für den M. Recklinghausen typischen Neurofibromen (Martin, GA, 1990).

Weiter mögliche Effektoren des Ras, wie zum Beispiel die Proteinkinase C ζ , Rin (Ras-interacting) und Rsb (Ras-binding) in Säugetieren und Adenylcyclase (*S. cerevisiae*) wurden identifiziert (Marshall, CJ, 1996).

Eine wichtige Superfamilie von signalübertragenden Proteinen steht ebenfalls in Wechselwirkung mit den Ras-Proteinen: die Familie der Phosphoinositidkinasen.

2.5 Phosphoinositid 3-Kinasen

Phosphoinositid 3-Kinasen (PI3K's) stellen eine Familie von Enzymen dar, die zur Phosphorylierung eines Inositolringes in Position D3 befähigt sind. Sie dienen der Signalübertragung in Zellen, sowie weiteren Regulationen von zellulären Prozessen wie zum Beispiel dem vesikulären Transport und Reparaturvorgängen der Desoxyribonukleinsäure. Auch sie wurden als Ras-Effektoren identifiziert.

Zunächst wurde die Unterfamilie der Heterodimeren, bestehend aus einer Regulatoruntereinheit (p85) und einer katalytischen Untereinheit von 110 kDa (p110 α und p110 β), entdeckt (Hiles, ID, 1992) (Hu, P, 1993). 1997 wurde die Existenz eines weiteren Heterodimers bekannt, die p110 δ (Vanhaesebroeck, B, 1997). Eine andere Form von Phosphoinositid 3-Kinasen wurde 1995 von Stoyanov *et al.* entdeckt: p110 γ (Stoyanov, B, 1993). Alle vier Subtypen besitzen eine PI3K-katalytische Domäne, eine PI3K-einheitliche Domäne und eine Ras-bindende Domäne. Allerdings lässt p110 γ im Gegensatz zu den anderen Formen eine p85-bindende Domäne vermissen (Abb.4) (Rubio, I, 1997) (Stoyanov, B, 1995).

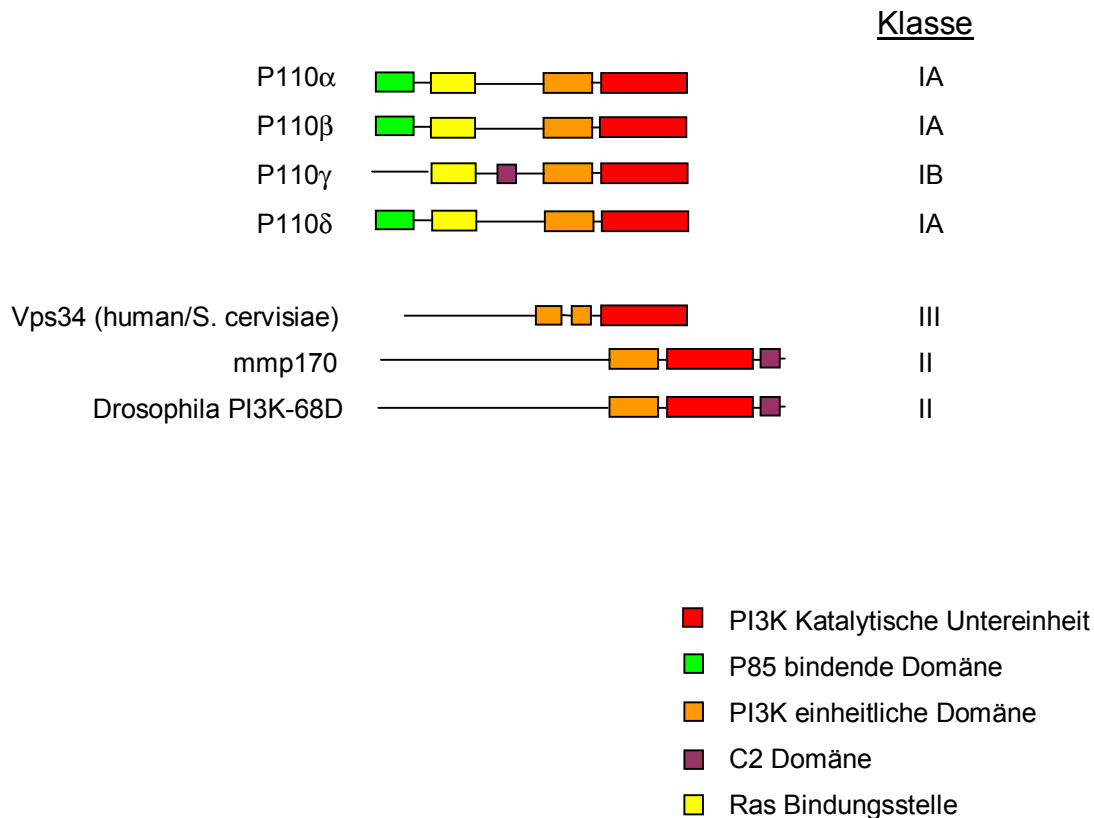
Diese PI3K, die sich aus p110 und einer Regulationseinheit zusammensetzen wurden als Typ I Kinasen klassifiziert. Die hauptsächlichen Lipidprodukte der Klasse I Phosphoinositid 3-Kinasen sind *in vitro* die PtdIns, PtdIns(4)P und PtdIns(4,5)P₂, *in vivo* bevorzugen sie PtdIns(4,5)P₂ als Substrat. Sie sind an der Signalübertragung unterhalb von Tyrosinkinasen und heterotrimeren G-Protein-Rezeptoren beteiligt. Zu der Subspezialisierung Klasse IA gehören drei Isoformen: p110 α , β und δ . Sie besitzen mindestens sieben Regulationsproteine, welche durch unterschiedliches Splicen aus drei Genen hervorgehen, genannt p85 α , p85 β und p55 γ . Die einzige zur Zeit identifizierte Klasse IB Kinase ist p110 γ (wie man inzwischen weiß mit p101 als Regulatoreinheit). Im Gegensatz zu den Klasse IA Proteinen wird die p110 γ durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren reguliert (Vanhaesebroeck, B, 2001) (Brock, C, 2003) (Vanhaesebroeck, B, 2005).

Typ II Enzyme enthalten typischerweise eine so genannte C-terminale C2-Domäne und bevorzugen Phosphatidylinositol und/oder PtdIns4P als Substrate, in geringerem Umfang auch PtdIns(4,5)P₂. Im Gegensatz dazu haben die Klasse III Kinasen nur Phosphatidylinositol als Substrat und sind wahrscheinlich der Hauptproduzent von PtdIns3P in den Zellen (Stephens, LR, 1997) (Vanhaesebroeck, B, 2001).

Abb.4: Phosphoinositid 3-Kinasen

Schematische Repräsentation der PI3K Familienmitglieder nach ihrem Aufbau und nach ihrer Klasseneinteilung (Rubio, I, 1997).

P110 γ besitzt keine p85 bindende Domäne, ist also auch nicht in der Lage an die Regulatoruntereinheit zu binden.



Das Regulatorprotein p85 besitzt keine enzymatische Aktivität, statt dessen enthält es eine große Anzahl von Domänen der Protein-Protein-Interaktion. Am bekanntesten ist sicherlich die SH2-Domäne (SRC homologe Domäne) (Songyang, Z, 1993). Die Bindung von Tyrosinphosphat-beinhaltenden Peptidsequenzen an die SH2-Domäne der PI3K aktiviert die katalytische Untereinheit p110 α und β und führt die zytosolische PI3K zu der Quelle der Phospholipidsubstrate, was zu einer Zunahme von Phosphatidylinositol(3,4,5) - triphosphat (PIP $_3$) führt (Carpenter, CC, 1993) (Zhang, S, 2000). Ähnlich der γ - Familie der PI-PLCs (Phosphoinositid-Phospholipase C), die durch rezeptorsensitive Tyrosinkinasen reguliert wird, funktionieren auch Klasse IA PI3Ks als Signalvermittler unterhalb von Tyrosinkinasen. Schon nach wenigen Minuten sinkt der Spiegel an PIP $_3$ durch PI-Phosphatasen wieder ab (Stephens, LR, 1991) (Stephens, LR, 1993)

Das Produkt der PI3K, Phosphatidylinositol(3,4,5)P₃ (PIP₃), kann mit hoher Affinität

Die Bindung der PI3K α oder β an einen aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptor aktiviert die

Auf diese Weise könnte PIP_3 eine Verbindung zur $G\beta$ -vermittelten MAPK-Signalübertragung darstellen. Eine existierende Verbindung zum MAPK-Signalweg wurde bereits 1999 durch Wennström und Mitarbeiter nachgewiesen. Eine Inhibition der PI3K führte in COS-7 Zellen bei nur moderaten EGF-Konzentrationen zu einer verminderten Aktivität sowohl des Ras, als auch der ERK. Es ergaben sich Hinweise, dass die PI3K oberhalb und unterhalb des Ras agiert (Wennström, S, 1999).

Noch ist allerdings noch nicht vollständig geklärt auf welche Weise die PI3K die Signale überträgt. Einige Wissenschaftler vertreten die Hypothese, dass $PI(3,4)P_2$ und $PI(3,4,5)P_3$ in Anbetracht ihrer einheitlichen chemischen Natur und den negativ geladenen Gruppen die Vielfältigkeit der biologischen Veränderungen, verursacht durch die PI3 Kinase, durch strukturelle und physikalische Veränderungen und/oder durch Veränderungen im Zytoskelett hervorrufen (Stephens, LR, 1993). Eine andere Möglichkeit ist die Aktivierung eines klassischen second-messenger-Moleküls. Inzwischen weiß man, dass die Phosphoinositide Akt und einige Isoformen der Proteinkinase C aktiviert werden (Franke, TF, 1997) (Toker, A, 1994) (Ng, SSW, 2000) (Wymann, MP, 1998). Nachweislich schützt zum Beispiel aktiviertes mutiertes Ras vor dem Zelluntergang nach Lösung aus dem Zellverband über die katalytische p110-Untereinheit durch Aktivierung der PKB/AKT, einer Serin-Threonin-Kinase (Khwaja, A, 1997) (Watton, SJ, 1999). Für weitere Proteine, die mit Lipidprodukten der PI3K reagieren siehe: (Klarlung, JK, 1997).

Weitere Möglichkeiten der Regulation durch die Untereinheit p85 beinhaltet die Bindung an prolinreiche Regionen der SH3 Domäne von Src und Src-Familienmitgliedern, die Bindung der Rho-Familie-Proteine CDC42 und Rac an die BCR-verwandte Domäne, die Phosphorylierung von p85 an Tyr 580 und Tyr 508, sowie die Autophosphorylierung von p85 durch die p110-Kinase an Ser 608 (Rodriguez-Viciano, P, 1996).

Zu einer weiteren Klasse von PI3K gehört Vps34 aus *Saccharomyces cerevisiae* und seine Gegenstücke in Säugetiere. Vps34 phosphoryliert lediglich PtdIns zu $PI3P$ (Volinia, S, 1995) (Kunz, J, 1993). In Hefezellen reagiert Vps34 mit einer Proteinkinase Vps15, bzw. p150 in Säugetierzellen. Diese scheinen Regulatoren der Vps34-Aktivität zu sein. Die physiologische Funktion einer weiteren Gruppe PI3K-verwandter Proteine, die TOR Kinasen, ist die Regulation des Zellwachstums. Es konnte keine Lipidkinase-Aktivität nachgewiesen werden, aber einige Mitglieder

dieser Familie zeigen eine Proteinkinase-Aktivität (Hartley, KO, 1995). Eine andere Familie von Phosphoinositid 3-Kinasen, die nicht befähigt ist PI(4,5)P₂ zu phosphorylieren, wurde entdeckt. Dazu gehören Cpk-m in Mäusen, das homologe Cpk der Drosophila und Drosophila DmPi3K-68D. Diese PI3K besitzen eine C-terminale C2-Domäne. Möglicherweise handelt es sich dabei um eine Verankerung in der Membran. Die C2-Domäne konnte auch in verschiedenen anderen Proteinen wie Synaptotagmin, einigen Isoformen der PKC und Rabphilin gefunden werden (Virabius, JV, 1996) (Molz, L, 1996) (MacDougall, LK, 1995) (Nishizuka, Y, 1992).

2.6 Die Verbindung zwischen Phosphoinositid 3-Kinasen und Ras

Auch einige Phosphoinositid 3-Kinasen stellen Effektoren des Ras dar. Rodriguez-Viciana wies durch *in vitro*-Experimente nach, dass die PI3K α und β durch direkte Interaktion mit Ras-GTP, aber nicht mit Ras-GDP reagiert, was zu einer Erhöhung der enzymatischen Aktivität der PI3K führt. Umgekehrt verhinderte eine Punktmutation K227E im Bereich der Ras-Bindungsstelle (AS 133 – AS 314) der p110 α und β eine GTP-abhängige Reaktion der p110 α mit Ras *in vitro* und die Steigerung der enzymatischen Aktivität der PI3K durch Ras in PC12-Zellen (Rodriguez-Viciana, P, 1994) (Rodriguez-Viciana, P, 1996). Auch Kodaki *et al.* wies eine direkte Interaktion zwischen der katalytischen Untereinheit und Ras nach (Kodaki, T, 1994). Unklar ist bis jetzt, ob die PI3K oberhalb oder unterhalb des Ras in der Signalkaskade einzuordnen ist. Versuche mit einer konstitutiv aktivierten Version der PI3K zeigten, dass diese Mutante Ras für die Transkription eines Ras-sensitiven Promotors benötigt. Sie verursachte eine Aktivierung des Ras in den GTP-gebundenen Zustand (Hu, Q, 1995). Dies ist nur schwer in Einklang zu bringen mit den Ergebnissen Rodriguez-Vicianas (Rodriguez-Viciana, P, 1997), nach denen das Ras die PI3K reguliert. Eine Funktion der PI3K besteht möglicherweise darin, die GTPase Rac durch das Ras zu aktivieren. Denn es wurde sowohl nachgewiesen, dass eine Aktivierung des Rac benötigt wird für Veränderungen des Aktinzytoskelett durch Ras (Ridley, AJ, 1992) (Li, G, 1997), als

auch die Aktivierung des Ras durch eine PI3K-Aktivierung verursacht sein kann (Parker, PJ, 1995).

Stoyanov *et al.* klonierten und charakterisierten einen weiteren Isotyp der PI3K: p110 γ . Dieses Enzym wird *in vitro* sowohl von der α - Untereinheit, als auch von der $\beta\gamma$ - Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine aktiviert. Es gibt keine Ähnlichkeit mit der NH2 terminalen Region der p110 α oder der p110 β durch die diese p85 α , bzw. p85 β binden. Folglich zeigt die p110 γ keine Interaktion mit p85 (Abb.4). Allerdings existiert – wie man inzwischen weiß - für die p110 γ eine andere Untereinheit: p101. Der Effekt der G $\beta\gamma$ - Untereinheit auf die Aktivität der p110 γ kann sowohl *in vivo*, als auch *in vitro* durch p101 auf das Hundertfache gesteigert werden (Stephens, LR, 1997). Es wurde festgestellt, dass die Regulatoreinheit p101 der PI3K γ an G $\beta\gamma$ bindet und dadurch die katalytische Einheit p110 γ an die Plasmamembran rekrutiert (Brock, C, 2003) (Voigt, P, 2005).

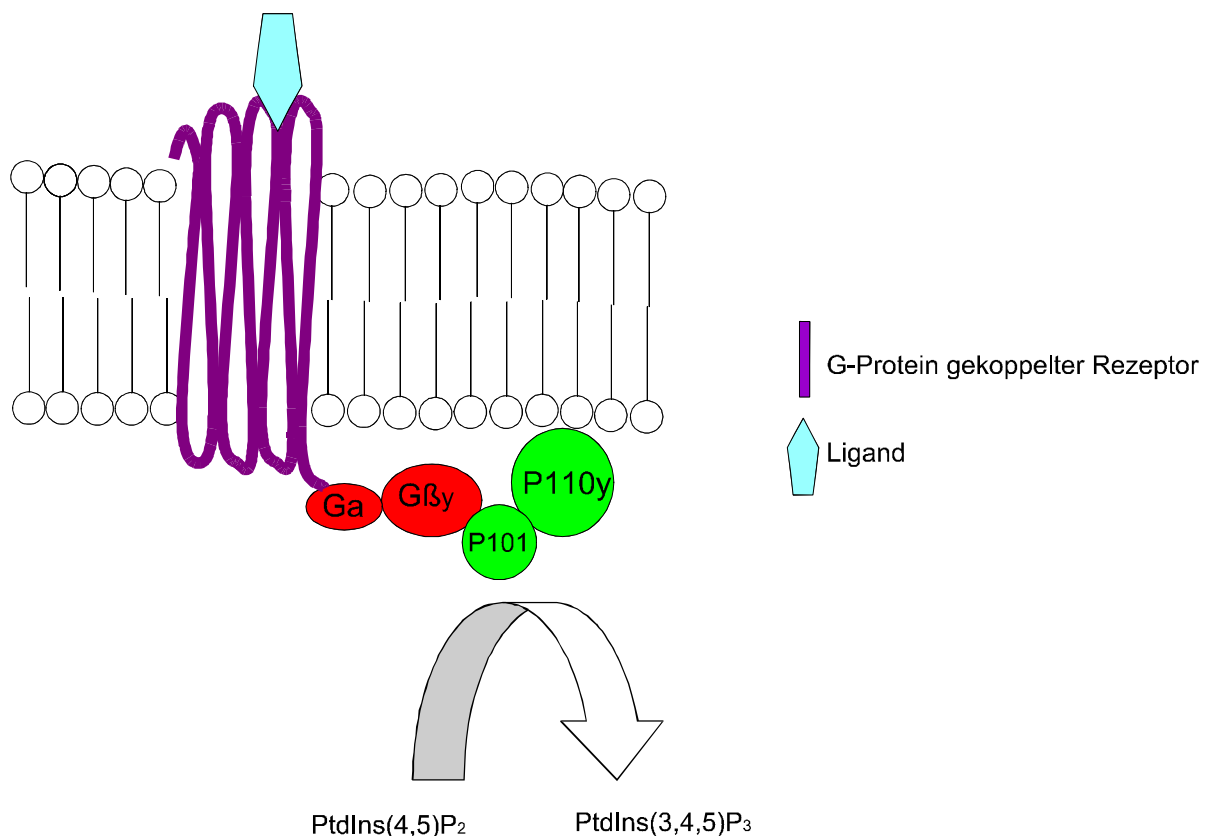


Abb.6: Funktion der Regulatoreinheit p101

p101 bindet an die G $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins und bringt damit p110 γ zu seinen Substraten an die Plasmamembran.

Ähnlich der Isoform p110 α , die über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (s.o.) Einfluss auf den MAPK-Signalweg nimmt, gibt es Hinweise, dass neben dem Ras-Protein auch p110 γ an der Aktivierung der MAPKinase beteiligt ist, allerdings G $\beta\gamma$ - vermittelt. Diese Signalübertragung konnte durch eine dominant negative Form des Ras blockiert werden und sie scheint abhängig von der enzymatischen Aktivität der p110 γ zu sein (Lopez-Illasaca, M, 1997) (Wymann, MP, 1998). Ebenso konnte Bondeva *et al.* eine Wortmannin-sensitive Aktivierung der MAPK in COS7-Zellen nachweisen. Bei einer katalytisch inaktiven PI3K γ fehlte diese Aktivierung. Interessanterweise weist PI3K γ sowohl eine Proteinkinaseaktivität als auch eine Lipidkinaseaktivität auf. Wie gerade beschrieben scheint die Proteinkinaseaktivität in die Regulation des MAPK-Signalweges involviert zu sein. Hingegen entstehen durch die Lipidkinaseaktivität der PI3K γ PtdInsP₃. Die bei der membrangebundenen Form PI3K γ -CAAX produzierten Lipidprodukte (PtdIns(3,4,5)P₃) aktivieren die Akt/PKB Kinase in Cos7-Zellen (Bondeva, T, 1998) und in Oozyten von *Xenopus laevis* (Hehl, S, 2001). Dabei scheint die Konzentration der G-Proteine eine wichtige Rolle bezüglich der alternativen Stimulation zu spielen. Eine geringe Konzentration der G-Proteine führt zu einer leichten Erhöhung der Protein- und der Lipidkinaseaktivität. Hohe Konzentrationen hingegen stimulieren die Lipidkinaseaktivität maximal, doch die Proteinkinaseaktivität wird vermindert (Bondev, A, 1999).

Noch weitere Fälle der GPCR-vermittelten MAPK Aktivierung durch p110 γ wurden entdeckt, so beim M1 und M2 Muskarin Rezeptor (Murga, C, 1998) (Lopez-Illasaca, M, 1997).

Überraschend dagegen sind die jüngsten Ergebnisse von Zieger *et al.* Auch diese Forschungen wiesen eine G $\beta\gamma$ - vermittelte Wortmannin-sensitive Aktivierung der MAPK durch den Cholecystokinrezeptor B in COS7-Zellen nach. Aber diese Aktivierung ist p85-abhängig, so dass eine Beteiligung der PI3K γ in diesem Fall ausgeschlossen ist (Zieger, M, 2000).

Wie bereits besprochen aktiviert Ras nicht nur den MAPK-Signalweg, sondern noch weitere ähnlich modellierte Signalübertragungswege, darunter auch die Jun Kinase. Es überrascht nicht, dass sich auch hier ein Berührungspunkt zwischen der p110 γ und dem Ras Protein fand, denn ebenfalls konnte hier eine G $\beta\gamma$ -vermittelte

Aktivierung der Jun Kinase durch die PI3Kγ nachgewiesen werden (Lopez-Illasaca, M, 1998).

2.7 Malignes Wachstum durch Ras

Veränderungen im Genom der Zelle, die eine Änderung im genkontrollierten Zellwachstum oder in der Zelldifferenzierung verursachen, stellen eine wichtige Ursache des malignen Wachstums dar. Die molekulare Zellforschung hat es sich zum Ziel gemacht diese veränderten Gene in den verschiedenen Tumortypen zu identifizieren und ihre Rolle in der Karzinogenese zu verstehen. Mutierte ras-Gene fielen das erste Mal auf durch ihre Fähigkeit NIH/3T3-Zellen nach DNA - Transfection zu transformieren. Die anschließende Analyse von tumorösen Gewebeproben aus einem Teil der humanen Karzinome ergab, dass eines der drei ras-Gene häufig eine Punktmutation besaß. Die kritische Position scheint dabei die AS 12, 13 und 61 zu sein (Barbacid, M, 1987) (Boguski, MS, 1993). Aber auch Mutationen in Position 59 spielen eine wichtige Rolle (Tab.1) (Lewin, B, „Gene“, 1. Auflage). Durch die Mutation zeigen sich die Proteine gegenüber GAP-vermittelte GTPase-Stimulation resistent und verbleiben in der GTP-gebundenen, aktiven Form.

Tab.1: Ras-Mutationen in Tumorgewebe

Verschiedene Punktmutationen in verschiedenen Rasformen führen zu verschiedenen Carzinomarten.

Proto-Onkogen, bzw. Onkogen	Aminosäuretest in Position			Tumor, aus dem die Onkogen-Variante isoliert wurde
	12	59	61	
c-ras (H, K, N)	Gly	Ala	Gln	Wildtyp-Sequenz aus dem Genom
H-ras	-	-	Leu	Lungen-Karzinom Hs242
	Val	-	-	Blasen-Karzinom T24
K-ras	Cys	-	-	Lungen-Karzinom Calu-1
	Arg	-	-	Lungen-Karzinom LC-10
	Val	-	-	Colon-Karzinom SW480
N-ras	-	-	Lys	Neuroblastom SK-N-SH
	-	-	Arg	Lungen-Karzinom SW1271
H-ras	Arg	Thr	-	Harvey-Maus-Sarkom-Virus
K-ras	Ser	Thr	-	Kirsten-Maus-Sarkom Virus

Offenbar stehen die ras-Gene sehr knapp vor der Schwelle zur Onkogenese, denn fast jede Mutation an Position 12,13 oder 61 verwandelt das ras-Protoonkogen in ein aktives Onkogen (Page, MJ, 1989). Alle drei ras-Gene haben Glycin an Position 12, doch wird Glycin durch eine der anderen neunzehn Aminosäuren – mit Ausnahme des Prolins – ersetzt, so kann das mutierte ras-Gen Zellkulturzellen transformieren. Der jeweilige Austausch beeinflusst allerdings die Stärke der transformierenden Aktivität. Die Position 61 wird in den Wildtyp-ras-Genen von Glutamin eingenommen. Sein Austausch führt in den allermeisten Fällen zu einem Onkogen. Einige Austausche sind aber wesentlich schwächer als andere. Nur Prolin und Glutaminsäure haben in Position 61 keinerlei Effekt (Lewin, B., „Gene“, 1. Auflage). Aber nicht in allen Gewebeproben fand sich eine Punktmutation. So wurde in einer humanen Colonkarzinomlinie und in einer Nebennierenkarzinomlinie der Maus eine Amplifikation des K-ras anstelle einer Punktmutation beobachtet (Lewin, B., „Gene“, 1. Auflage).

Auf der Suche von veränderten ras-Genen in humanen Tumorgeweben zeigte sich, dass 30% aller humanen Tumorarten assoziiert sind mit mutierten Formen der drei ras-Gene (Clark, GJ, 1993). Die Adenokarzinome des Pankreas zeigen dabei die größte Häufigkeit von ras-Mutationen, nämlich zwischen 75 – 93%. Auch andere Karzinome besitzen eine nicht unerhebliche Häufigkeit von ras-Mutationen: das Adenokarzinom des Colons (40 - 47%), das follikuläre Schilddrüsenkarzinom (ca. 53%), das undifferenzierte Schilddrüsenkarzinom (ca. 60%), das follikuläre Mikroadenom der Schilddrüse (ca. 50%), das Seminom (ca.43%), das myelodysplastische Syndrom (5 – 41%) und die akute myeloische Leukämie (19 – 70%) (Bos, J.L, 1989) (Watanabe, T, 2000).

Bekannt ist, dass die Apoptose, ausgelöst durch die Zellablösung vom Untergrund, nicht bei epithelialen Zellen auftritt, in denen aktiviertes ras-Onkogen oder aktiviertes src expremiert wird (Frisch, SM, 1994). In der MDCK-Zelllinie ist als Schutz vor dem programmierten Zelltod die Raf-MAPK-Signalübertragung nicht involviert, stattdessen ist der PI3K-Signalweg sowohl nötig als auch ausreichend. Die PI3K scheint dabei mittels Aktivierung der Proteinkinase B (Akt oder Rac Kinase), einer Serin/Threonin-Kinase (Coffer, PJ, 1991) (Jones, PF, 1991) (Bellacosa, A, 1991) zu arbeiten. Normalerweise führt die Lösung von der Matrix zu einem schnellen Abfall der PI3K-Produkte und der PKB/Akt-Aktivität, während eine Matrixbindung eine schnelle Erhöhung dieser Lipide und der Kinaseaktivität mit sich

bringt. Dieser Signalweg (Ras – PI3 Kinase – PBK/Akt) schützt also die epitheliale Zelle vor dem programmierten Zelltod (Khwaja, A, 1997).

Es mehren sich die Hinweise, dass für eine Transformation einer Zelle nicht ein Signalweg, sondern mehrere Signalwege beteiligt sind. Dies erscheint auch in Anbetracht der Vernetzung unterschiedlicher GTPase-Signalwege logisch zu sein (siehe Kapitel 1.4). In Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass für die Transformation von Säugetierzellen mindestens zwei Effektorsignalwege durch Ras aktiviert werden müssen. Diese Signalwege können Raf und PI3K sein, oder Raf, bzw. PI3K mit jeweils Ral-GDS (Rodriguez-Viciano, P, 1997). Anderen Beobachtungen zufolge wird für die Ras-Transformation von Fibroblasten mindestens die Aktivierung von Raf und eines anderen Effektors benötigt. Zwar ist die konstitutiv aktivierte Mutante von Mek in der Lage Nagerfibroblasten zu transformieren, doch wird dieser Effekt verhindert durch Hemmung der endogenen Rasfunktion (Cowley, S, 1994) (Dudley, DT, 1995). Großes Interesse gilt der Rho-Unterfamilie. Während die dominant negativen Varianten von Rho (N19Rho) oder Rac (N17Rac) die Transformation durch das onkogene Ras blockieren, zeigen die aktivierten Versionen (V14Rho oder V12Rac, bzw. Rac1(115I) und RhoA(63L)) eine transformierende Aktivität (Qiu, RG, 1995) (Wennström, SHP., 1994) (Khosravi – Far, R, 1995). Dies bedeutet, dass sowohl die Aktivierung von Rac1 und RhoA, als auch die Aktivierung des Raf/MAPK-Signalwegs durch onkogenes Ras für die volle Ausbildung der Zelltransformation in NIH 3T3 Zellen benötigt wird. Des Weiteren wurde ein Synergismus bei der Vermittlung der Transformation zwischen V12Rac und aktiviertem Raf beobachtet (Qiu, RG, 1995). Zur Fibroblastentransformation scheinen danach mindestens die Aktivierung von Raf und Rac nötig zu sein. Eine Verbindung könnte die PI3K sein, denn es gibt Hinweise, dass Ras Rac über die PI3-Kinase aktiviert (Wennström, SHP, 1994) (Hawkins, PT, 1995). Widersprüchlich sind allerdings Ergebnisse, nach denen eine Membrankräuselung, das sgn. „membrane ruffling“, in BHK-21-Zellen durch Rac1 verursacht wird, aber unabhängig von der PI3K ist (Li, G, 1997).

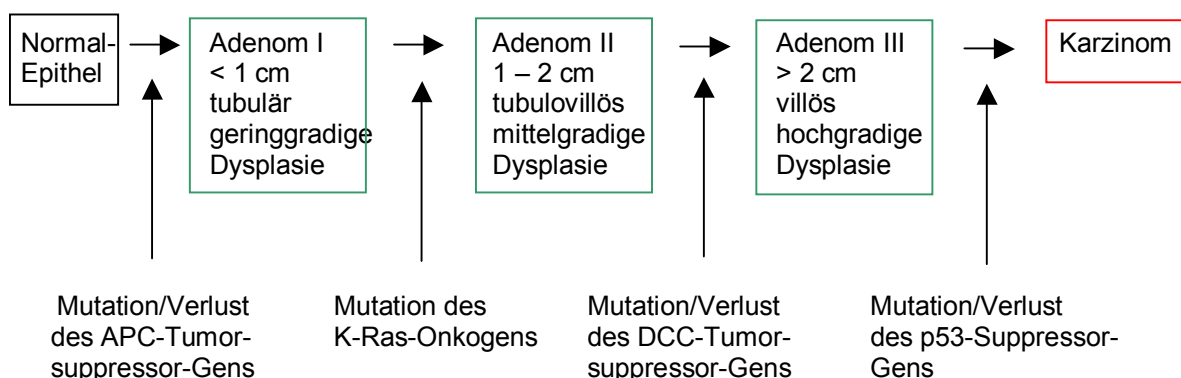
Zellen des nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms führen durch die Ras-vermittelte Transformation zu einer Erhöhung der cytosolischen Phospholipase A2 und der Cyclooxygenase 2, und zwar durch die Aktivierung des JNK- und des ERK-Signalweges zusammen (Van Putten, V, 2000).

Auch mittels Ras-Mutanten, die selektiv nur mit bestimmten Effektoren interagieren, konnte nachgewiesen werden, dass Ras mehrere Signalwege aktiviert um eine Transformation zu verursachen (White, MA, 1995).

Abgesehen, dass das Ras vermutlich mehrere Signalwege zur Transformation aktiviert, scheinen neben Ras-Mutanten auch andere Veränderungen in Genom eine Rolle zu spielen. Vogelstein und Mitarbeiter stellten zum Beispiel ein Tumorprogressionsmodell für das colorektale Karzinom auf, wonach die Tumorprogression vom Normalgewebe über das Adenom zum Karzinom etwa 3 – 5 Jahre dauert und verursacht wird durch eine Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen (Abb.7). Dabei handelt es sich um Aktivierungen von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgen. Ist eine kritische Gesamtzahl an genetischen Veränderungen eingetreten, kann das anfangs noch kontrollierte Wachstumsverhalten in ein unkontrolliertes, malignes Wachstum übergehen (Herold, G, 1997).

Abb.7: Tumorprogressionsmodell für das colorektale Karzinom

Durch eine Anhäufung verschiedener genet. Mutationen entwickelt sich in einem Zeitraum von 3 -5 Jahren aus einem colorectalen Adenom ein colorectales Karzinom.



Großes Interesse gilt selbstverständlich Substanzen, die in der Lage sind die Transformation einer Zelle zu verhindern. Zum Beispiel sind sowohl Krev-1/Rap 1A (Kitayama, H, 1989) (Kitayama, H, 1990), als auch Rheb (Clark, GJ, 1997) sind dazu in der Lage. Beide besitzen eine große Ähnlichkeit mit Ras und den Ras-verwandten Proteinen (Yamagata, K, 1994) (Kitayama, H, 1989) (Kitayama, H, 1990). Noch ist aber unklar, auf welche Weise sie diese Funktion vermitteln und was ihre physiologische Funktion ist. Krev-1 benötigt zum Beispiel eine hohe Konzentration zur Hemmung der Transformation (Kitayama, H, 1989).

3 Ziele der Arbeit

Es sind einige Interaktionen des Ras mit den verschiedenen Isoformen der Phosphoinositid 3-Kinase bekannt. Beleuchtet werden soll in dieser Arbeit die Wechselwirkung des Ras mit der Isoform p110 γ . Es stellt sich die Frage auf welche Weise Ras in Abhängigkeit von seiner Nukleotidbeladung mit PI3K γ interagiert, bzw. welche Effekte das zur Folge hat. Und welche Rolle spielt dabei die posttranslationale Modifizierung des Ras? Diese Aspekte näher zu beleuchten war Ziel dieser Arbeit.

4 Materialien und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Zelllinien

SF9-Zellen: (Spodoptera frugiperda)

Freundlicherweise bereitgestellt von Dr. M. Waterfield, London,
UK

4.1.2 Zellkultur-Reagenzien

IPL 41: Medium für SF9-Zellen, (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

FCS: Zusatz zu IPL41 Medium, (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

Yeastolate: Zusatz zu IPL41 Medium, (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

Lipidkonz.: Zusatz zu IPL41 Medium, (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

Fungizone: Fungizid, (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

Gentamycin: Antibiotikum, (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA)

4.1.3 Medien/Puffer

<u>Bindungspuffer:</u>	50 mM Hepes pH 7,5 RT
	100 mM NaCl
	5 mM MgCl ₂
	0,1 mg/ml BSA (f.a.f.)
	40 mM n-Octylglucosid
	(Calbiochem/Applichem, San Diego, USA)

<u>Glycerol Puffer:</u>	50 mM Hepes pH 7,5 bei RT 5 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 50% Glycerol
<u>Hypotoner Puffer:</u>	25 mM TrisCl pH 7,5 bei RT 10 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT (Roth, Karlsruhe) Proteaseinhibitoren: 1 mM Benzamidin (Merck, Darmstadt) 10 mM Pefabloc (Merck, Darmstadt) 200 KIU/ml Aprotinin (Bayer, Leverkusen) 10 µg/ml Leupeptin (SIGMA, Steinheim) 1 mM PMSF (Roth, Karlsruhe)
<u>Lyse Puffer:</u>	50 mM Tris.HCL (pH 7,5) (Trizma, SIGMA, Steinheim) 150 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA 1% (v/v) TX-100 (Roth, Karlsruhe) Zugabe unmittelbar vor Benutzung: 1 mM DTT (Roth, Karlsruhe) 1 mM PMSF (Roth, Karlsruhe) 1 mM Benzamidin (Merck, Darmstadt) 10 µg/ml Leupeptin (SIGMA, Sigma) 200 KIU/ml Aprotinin (Bayer, Leverkusen) 10 mM Pefabloc (Merck, Darmstadt)
<u>Lyse Puffer mit EGTA:</u>	siehe Lyse Puffer + 15 mM EGTA

<u>Lyse Puffer mit EDTA:</u>	siehe Lyse Puffer + 15 mM EDTA (bzw. 10 mM, Kap. 3.8)
<u>Lyse Puffer mit FTS:</u>	siehe Lyse Puffer + 500 μ M FTS
<u>PBS:</u>	(Phosphate buffered saline) 20 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 80 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 100 mM NaCl pH 7,5
<u>PBST:</u>	PBS + 0.1 % (w/v) Tween 20 (Serva, Heidelberg)
<u>PIK:</u>	50 mM HEPES pH 7,5 100 mM NaCl 2 mM MgCl_2 1 mM EGTA
<u>Puffer A (40 mM n-OG):</u>	25 mM TrisCl pH 7,5 bei RT 40 mM NaCl 5 mM MgCl_2 40 mM n-Octylglucosid (Calbiochem/Applichem, San Diego, USA)
<u>Puffer A:</u>	25 mM TrisCl pH 7,5 bei RT 40 mM NaCl 5 mM MgCl_2 30 mM n-Octylglucosid

Puffer B: 25 mM TrisCl pH 7,5 bei RT
1 M NaCl
5 mM MgCl₂
30 mM n-Octylglucosid

Puffer B (10mM GSH): 50 mM TrisCl pH 8,0 bei RT
100 mM NaCl
10 mM DTT
10 mM GSH

S75-Puffer: 25 mM Hepes pH 7,5 bei RT
150 mM NaCl
5 mM MgCl₂
30 mM n-Octylglucosid

Transferpuffer: Puffer für semi-dry transfer von SDS-Page getrennten
Proteinen auf eine PVDF-Membran
50 mM Trizma (SIGMA, Steinheim)
39 mM Glyzin
0.037 % (w/v) SDS
(Sodiumdodecylsulfat)
15 % (v/v) Methanol
pH = 9.5

Waschpuffer: 25 mM TrisCl pH 7.5 bei RT
40 mM NaCl
5 mM MgCl₂
1 mM DTT
Proteaseinhibitoren:
1 mM Benzamidin (Merck, Darmstadt)
10 mM Pefabloc (Merck, Darmstadt)
200 KIU/ml Aprotinin (Bayer, Leverkusen)
10 ug/ml Leupeptin (SIGMA, Steinheim)
1 mM PMSF (Roth, Karlsruhe)

4.1.4 Antikörper

Anti GST (z-5): polyklonal anti GST, von Santa Cruz, Santa Cruz, USA

Anti pan Ras: monoklonal anti Ras, erkennt H-, K- und R-Ras,
Oncogene Science

Goat-anti-Rabbit IgG coupled to Horseradish Peroxidase:

Zweiter Antikörper für „enhanced chemoluminescence
detection“ (ECL) von rabbit IgG Molekülen (Santa Cruz,
Santa Cruz, USA)

4.1.5 Baculoviren für Expression in SF9-Zellen

GST-p110 γ : codiert ein GST-Fusionsprotein von humanem p110 γ
(Stoyanov, B. 1995)

GST-p110 γ (K→R): codiert ein GST-Fusionprotein von humanem p110 γ mit
Punktmutation Lys799→Arg (Lopez-Illasaca, M, 1997)

GST- γ 108-775: codiert ein GST-Fusionprotein des Fragmentes AS 1-775
von humanem p110 γ (Rubio, I, 1997b)

GST- $\gamma\Delta$ 108-433: codiert ein GST-Fusionprotein des Fragmentes Δ AS 108-
433 von humanem p110 γ (Rubio, I, 1997b)

GST- γ 177-268: codiert ein GST-Fusionprotein des Fragmentes AS 177-
268 von humanem p110 γ (Rubio, I, 1997b)

wt H-Ras: codiert den Wildtyp von humanem H-Ras

V12 H-Ras codiert die Gly12→Val Punktmutante von humanem H-
Ras (Page, MJ, 1989) (Rodriguez-Viciano, 1996)

A38 H-Ras codiert die A38 Punktmutante von humanem H-Ras
(Hancock, JF, 1989)

4.1.6 Rekombinante Proteine für in vitro-Experimente

<u>GST-Fusionsproteine:</u>	Aufreinigung siehe Kap. „Methoden“
<u>Modifiziertes wt H-Ras:</u>	Aufreinigung siehe Kap. „Methoden“, „Ergebnisse“ und „Diskussion“
<u>unmodifiz. wt H-Ras, V12 H-Ras, A38 H-Ras, V12/S186 Ras und V12/S181/S14 Ras:</u>	freundlicherweise bereitgestellt von Dr. Rubio (Rubio, I., 1999)

4.1.7 Andere Materialien

<u>Mevastatin:</u>	SIGMA, Steinheim
<u>FPT III:</u>	Calbiochem/Applichem, San Diego, USA
<u>FTS:</u>	Calbiochem/Applichem, San Diego, USA
<u>Dialysefilter:</u>	Micro-Collodion-Bags 0,2µM (Sartorius, Göttingen)
<u>Mikrokonzentratoren:</u>	Millipore, Billerica, USA
<u>Anionenaustauschersäule:</u>	MonoQ HR 10/10 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
<u>Gelfiltration:</u>	Sephadex 75 (Pharmacia, Uppsala, Schweden)
<u>GSH-Sepharose:</u>	Pharmacia, Uppsala, Schweden

4.2 Methoden

4.2.1 Kultivierung und Infektion der SF9 Zellen

Die SF9 Zellen (*Spodoptera frugiperda*) wurden nach den Standardmethoden (King, L.A., 1992) behandelt. Die Zellen wurden routinemäßig bei 27°C inkubiert und auch das Kulturmedium wurde vor seiner Benutzung bei dieser Temperatur inkubiert. Als Kulturmedium wurde IPL41 (GIBCO BRL, Gaithersburg, USA) verwendet, ergänzt durch 10% fetal bovine serum. Die Kultivierung und die Baculovirusinfektion wurde unter der Anwesenheit von 1 % Fungizone und 0,1 % Gentamycin vorgenommen. Die SF9 Zellen wurden mindestens zweimal in der Woche subkultiviert. Für die Virusinfektion werden die Zellen mechanisch vom Untergrund durch vorsichtiges Klopfen an die Außenwand gelöst und im Verhältnis 1:3 auf die neuen Flaschen mit frischem Medium verteilt. Zur Anheftung der Zellen wurden die Kulturflaschen 60 Minuten bei 27°C inkubiert und anschließend mit empirisch festgelegtem Titer des Baculovirus infiziert. Es folgte bis zur Ernte eine weitere Inkubation bei 27°C für 48-60 h.

4.2.2 Aufreinigung von membrangebundenem Ras in SF9-Zellen

Die SF9-Zellen wurden 48 h nach der Infektion mit Baculovirus geerntet und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe eines hypotonen Puffers (6-faches Pelletvolumen) und energischem rühren, sowie durch mechanische Homogenisierung mit einem Potter (10 Durchgänge) und Ultraschall (3 x 10 bursts, setting 3 auf einem Branson tip sonifier 250) aufgeschlossen. Die homogenisierte Lösung wurde 5 Minuten bei 1000 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Pellet zweimal mit Waschpuffer durch erneute Resuspension und anschließender Zentrifugation für 1 h bei 40000 rpm und 4°C gewaschen. Das modifizierte Ras (und andere Membranproteine) wurde durch Zugabe von 6-fachem Pelletvolumen Puffer A (40 mM n-Og) aus der Membran gelöst. Nach erneuter Zentrifugation (Einstellungen wie zuvor) befindet sich das Ras also im Überstand.

Dieser wurde unter Verwendung eines 0,2 μ M Filters von Sartorius (Göttingen) gereinigt und auf die Anionenaustauschersäule MonoQ HR 10/10 (Pharmacia, Uppsala, Schweden) geladen (Puffer A und B). Anschließend wurden die Fraktionen, die das Ras enthielten, gepoolt und durch einen Mikrokonzentrator von Millipore, Billerica, USA (5 kD) konzentriert. Die Gelfiltration erfolgte unter Verwendung der Superdex 75 Säule (Pharmacia, Uppsala, Schweden) und dem S75-Puffer.

Zu beachten ist, dass nach Lösung des modifizierten Ras aus der Zellmembran alle Puffer 30 mM n-Octylglucosid enthielten, damit das aus der Membran gelöste mRas auch weiterhin in Lösung gehalten wurde. Entsprechend konnte bei der Aufreinigung von unmodifiziertem Ras auf die Beigabe von n-Octylglucosid als Detergenz verzichtet werden.

4.2.3 Aufreinigung von GST- Fusionsproteinen

Die GST-gebundenen Proteine wurden aus SF9-Zellen aufgereinigt. 48 h nach der Infektion mit dem Baculovirussystem erfolgte die Ernte der Zellen durch vorsichtiges Abklopfen vom Untergrund. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1000rpm und dem einmaligen Waschen mit kaltem PBS-Puffer wurden die Zellen mit Hilfe des Lyse Puffers (LB) aufgeschlossen. Dazu wurde das fünffache Pelletvolumen an LB verwendet. Die Lösung wurde kräftig durchmischt und anschließend 30 Min. auf Eis gestellt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4°C und 10000 rpm für 30 Min. Das Pellet wurde verworfen, in den Überstand wurde 1 ml mit LB gewaschene (1:1) GSH-Sepharose von Pharmacia hinzugefügt und bei 4°C auf einem Drehrad für 3 h inkubiert. Anschließend wurde die GSH-Sepharose 3 mal mit Lyse Puffer und zweimal mit PIK gewaschen. Für die Lagerung bei -80°C wurde Glycerol Puffer hinzugefügt.

Um eine Lösung der GST-Fusionsproteine von der GSH-Sepharose zu erreichen, wurde diese nach zweimaligem Waschen mit Puffer A auf eine kleine Säule mit immobilisiertem Glutathion (zuvor mit Puffer B (1% TX-100) und Puffer A gewaschen) bei Raumtemperatur geladen. Die GST-p110 γ wurde durch Puffer B (10 mM GSH) eluiert und in Fraktionen von 150 μ l gesammelt. Die die GST-p110 γ -enthaltenden Fraktionen wurden anschließend durch SDS-Page und Coomassie-

Färbung identifiziert. Nach der Dialyse mit Glycerol Puffer durch Micro-collodium Bags erfolgte die Lagerung bei -20°C .

4.2.4 Western Blots

Zum selektiven Nachweis von Proteinen, getrennt durch SDS-Page, wurde das Verfahren des Western blotting eingesetzt. Dazu wurde das Gel der Elektrophorese 15 min in Transfer Puffer gelagert. Zwischen jeweils drei Lagen mit Transfer Puffer vollgesogenem Whatman 3 MM Papier wurde das Gel auf eine PVDF-Membran (polyvinylidenedifluoride) von Millipore (Billerica, USA) gelegt. Die Membran wurde zuvor nach den Hersteller-Angaben vorbereitet. Für den Transfer wurde der semi-dry transfer apparatus von Biorad verwendet. Die dabei verwendete Stromstärke ist abhängig von der Größe des Gels und lässt sich berechnen durch folgende Formel: $[\text{mA}] = \text{Gelgröße} [\text{cm}^2] \times 0.8$. Die Dauer des Transfers beträgt 90 min. Anschließend wurde die PVDF-Membran in PBST + 5 % Magermilch 1h bei Raumtemperatur geblockt. Als Alternative konnte das Blocken auch über Nacht bei 4°C stattfinden. Die Membran wurde 1h lang in PBST + 1 % Magermilch + dem entsprechenden Antiserum (Verdünnung siehe Herstellerangaben) inkubiert und danach einmal 15 min und zweimal 5 min in PBST gewaschen. Mit dem zweiten Antikörper wurde in gleicher Weise verfahren. Dieser bindet an die antigenen Determinanten des ersten Antikörpers und ist an das Enzym Meerrettichperoxidase („horseradish peroxidase“) (HRPO) kovalent gebunden um die Immunkomplexe sichtbar zu machen. Als Substrat für die Peroxidase wurde das ECL kit von Amersham, Braunschweig (basierend auf einer Chemilumineszenz-Methode) gemäß den Angaben des Herstellers verwendet.

4.2.5 In vitro Bindungsversuche

Um Ras-Proteine mit Guaninnukleotiden zu beladen, wird zu dem aufgereinigten, rekombinanten Ras (Endkonzentration nach Nukleotidbeladung $5\mu\text{M}$) Bindungspuffer mit EDTA (Endkonzentration von EDTA: 5 mM) hinzugeführt, sowie

0.5 mM GTP (bzw. GDP) als Endkonzentration. Nach einer fünfminütigen Inkubation bei 37°C wird MgCl_2 in einer Endkonzentration von 10 mM zugeführt. Bei modifiziertem Ras wird die Ladung mit Nukleotiden unter Anwesenheit von 30 mM n-Octylglucosid oder 0,1 % Triton X-100 in allen Puffern durchgeführt.

Die Bindungsversuche mit immobilisierten GST-Fusionsproteinen (Endkonzentration 0,15 μM) und freiem modifiziertem oder unmodifiziertem Ras (Endkonzentration 1 μM) werden mit PBS-Puffer (0,1 % Triton/30 mM n-OG und 5 mM MgCl_2) durchgeführt. Die Proben werden anschließend für 90 Minuten bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Darauf werden die Sepharose-beads 4 mal mit PBS-Puffer (ohne n-Octylglucosid) gewaschen und eine SDS-Page-Gelelektrophorese durchgeführt.

4.2.6 Messung der Phosphoinositid 3-Kinaseaktivität

Um die Aktivität der PI3K in Abhängigkeit von der Ras-Bindung, bzw. in Abhängigkeit von der Ras-Beladung mit GTP oder GDP, messen zu können wurde folgendermaßen vorgegangen. Zunächst wurden wie in 2.2.5 beschrieben die Nukleotidbeladung des mRas und uRas vorgenommen.

Im weiteren Verlauf wurde jedoch anstelle von PBS ein Puffer bestehend aus 50 mM Hepes pH 7,5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mg/ml BSA (f.a.f.) und 40 mM n-Octylglucosid verwendet. Zunächst wurden Proben mit 0,5 μM Ras und 2 μM GST-p110 γ als Endkonzentration, bzw. eine Probe nur mit GST-p110 γ und eine Probe jeweils nur mit Ras-GDP/GTP angefertigt (als Volumenausgleich wurde Glycerol Puffer verwendet). Die Inkubationszeit betrug eine 1 h bei 4°C. Es wurde jeder Probe GSH-Sepharose zugesetzt. Nach einer Inkubation auf dem Vortex von 15 Minuten bei 4°C und dreimaligem Waschen wurde 33 μl PI (Phosphatidylinositol), ATP und $\gamma^{32}\text{p}$ -ATP hinzugefügt. Wiederum erfolgte eine Inkubation für 15 min, jedoch bei 37°C auf dem Drehrad. Die Bindungsreaktion wurde durch die Zugabe von 400 μl Chloroform:10mMHCl:Methanol (1:1:2), 150 μl 10 mM HCL und 150 μl Chloroform unterbrochen. Dabei entstand ein zweiphasiges Gemisch. In der unteren, hydrophoben Phase befinden sich die PI-Moleküle, in der oberen hydrophilen Phase das ATP und die beads. Entsprechend wurde die

Radioaktivität von Proben der unteren Phase durch eine Cerenkov Zählung gemessen.

In einem weiteren Versuch wurden steigende Mengen an GST-p110 γ verwendet (Endkonzentration 0, 50nM, 200nM, 500nM, 1 μ M und 2 μ M), als Volumenausgleich wurde auch hier Glycerolpuffer verwendet. Das weitere Vorgehen war identisch.

Um die zellulären Verhältnisse nachzuahmen wurde ein weiteres Mal 140 μ M Phosphatidylcholin, 300 μ M Phosphatidylserin, 320 μ M Phosphatidylethanolamin, 320 μ M Phosphatidylinositol und 30 μ M Sphingomyelin (alle von SIGMA und in Chloroform gelöst) nach dem Waschen der Sepharose beads zugesetzt. Nach Verdampfen des Chloroforms wurde unter Verwendung von PIK (250 μ l) eine Bildung von Liposomen in einem Ultraschallwasserbad bei RT induziert. Anschließend wurde wieder wie oben beschrieben vorgegangen.

4.2.7 Versuche mit Zellmembranen der SF 9-Zellen

Eine weitere Möglichkeit die Ras-PI3K-Interaktion zu analysieren bestand darin, zu untersuchen, ob eine Mobilisierung von modifiziertem, membrangebundenem wtRas in das Cytosol durch die PI3K γ stattfindet. Für entsprechende Versuche wurden SF9-Zellen mit dem Baculovirussystem zur Expression von modifiziertem Ras infiziert und aufgeschlossen (beschrieben in 2.2.1 und 2.2.2). Das Pellet aus Membranbruchstücken wird mittels Waschpuffer (mit Proteaseinhibitoren) gereinigt und anschließend eine Suspension hergestellt, ebenfalls mit Waschpuffer. Nach dem Homogenisieren erfolgt eine kurze Zentrifugation bei 200 rpm und 4°C um die größten Partikel zu entfernen. Das Pellet wird verworfen und in den Überstand wird Waschpuffer und GDP mit einer Endkonzentration von 0,1 μ M hinzugefügt. Mit der Suspension werden vier Ansätze mit 0 M, 160 μ M, 325 μ M 650 μ M GST-p110 γ und jeweils Glycerol Puffer (zum Volumenausgleich) hergestellt. Die Inkubationszeit beträgt auf dem Drehrad bei Raumtemperatur 30 Min. Anschließend erfolgt eine einstündige Zentrifugation bei 30.000 rpm und 4°C. Sowohl von dem Überstand als auch von dem Pellet wurden Proben entnommen und daraus Western Blots gefertigt. Außerdem wurde ein Teil des Überstandes mit GSH-Sepharose inkubiert

um lösliche PI3K γ (in Bindung mit aus der Membran gelöstem Ras) zu binden. Auch davon wurden Proben einem Western Blot zugeführt.

Um zu untersuchen, ob Ras die PI3K γ an die Zellmembran rekrutiert, wurde nach demselben Prinzip vorgegangen, allerdings wurde neben wtRas auch die Ras-Mutante A38 eingesetzt.

2.2.9 In vitro Experimente mit verschiedenen Inhibitoren der Ras-Modifizierung und mit EGTA, bzw. EDTA

Durch Einsatz verschiedener Inhibitoren der Ras-Modifizierung sollte der Einfluss des Modifizierungsgrades auf die PI3K γ -Bindung untersucht werden. Dazu wurden SF9-Zellen wie zuvor beschrieben mit dem Baculovirus für GST-p110 γ und/oder für wt Ras infiziert. 56 Stunden später wurde Mevastatin (Endkonzentration 25 μ M), bzw. FPT III (100 μ M) hinzugefügt. FTS wurde 60 h nach Transfektion mit einer Endkonzentration von 25 μ M dazugegeben. Außerdem wurde als Kontrolle auch eine Probe mit DMSO hergestellt, da sich Mevastatin und FTS in DMSO befinden. Die Ernte der Zellen erfolgt 72 h nach der Infektion. Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte der Aufschluss der Zellen mittels eines Lyse Puffers. Jeweils ein Ansatz mit GST-p110 γ und wt Ras wurde mit einem EGTA-haltigen (15 mM), bzw. einem EDTA-haltigen (15 mM) Lyse Puffer eröffnet um den Einfluss von Calcium- und Magnesium-Ionen darzustellen.

Nach der Zentrifugation bei 10000 rpm für 15 Min (4°C) wurden Proben von den Überständen entnommen und Western Blot angefertigt. Anschließend wurde wie zuvor beschrieben GSH-Sepharose in die einzelnen Ansätze hinzugefügt um die GST-p110 γ -Ras-Komplexe zu binden. Beim Waschen anschließend wurden dieselben Puffer wie bei der Lyse verwendet. Auch von diesen Ansätzen wurden Western Blots gefertigt.

Da eine vermehrte Bindung von modifiziertem Ras an p110 γ unter EDTA-Lyse auffiel, sowie das Nichtauftreten einer Ras-Form, ebenfalls unter EDTA-Lyse, wurde der Einfluss von EDTA auf die Protein-Enzym-Interaktion weiter untersucht. Dazu wurden SF9-Zellen mit p110 γ und verschiedenen Ras-Mutanten durch das Baculovirussystem infiziert. Die Ernte erfolgte nach 48 h. Die Lyse erfolgte entweder mit dem Lyse Puffer oder mit dem Lyse Puffer mit 10mM EDTA.

Anschließend wurde wie bereits zuvor beschrieben vorgegangen. Zu beachten war, dass sowohl die „leere“ GSH-Sepharose, als auch die Sepharose nach Zugabe der Zell-Lysate nur mit dem jeweils entsprechenden Lyse-Puffer gewaschen werden durfte.

5 Ergebnisse

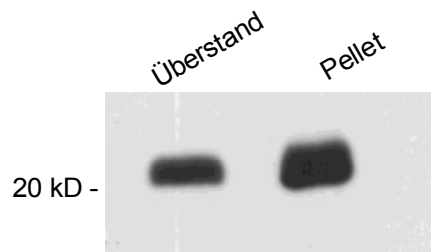
5.1 Aufreinigung von modifiziertem Ras

Modifiziertes Ras wurde aus SF9-Zellen, die mit dem entsprechenden Baculovirus infiziert wurden, aufgereinigt. Nach Eröffnung der Zellen wurde zunächst das Pellet von Membranbruchstücken lediglich einmal mit Waschpuffer gewaschen. Es befand sich danach jedoch noch unmodifiziertes Ras im Pellet, so dass in den weiteren Aufreinigungen ein zweiter Waschvorgang angeschlossen wurde.

Es wurden Proben von Überstand und Pellet zwischen den einzelnen Schritten der Aufreinigung entnommen. Im Western Blot zeigte sich, dass die eigentliche Limitierung der Ras-Endkonzentration in der Lösung des modifizierten Ras aus der Membran mittels des Puffers A (40 mM n-OG) besteht (Abb.8).

Abb.8: Lösung des modifizierten Ras aus der Membran

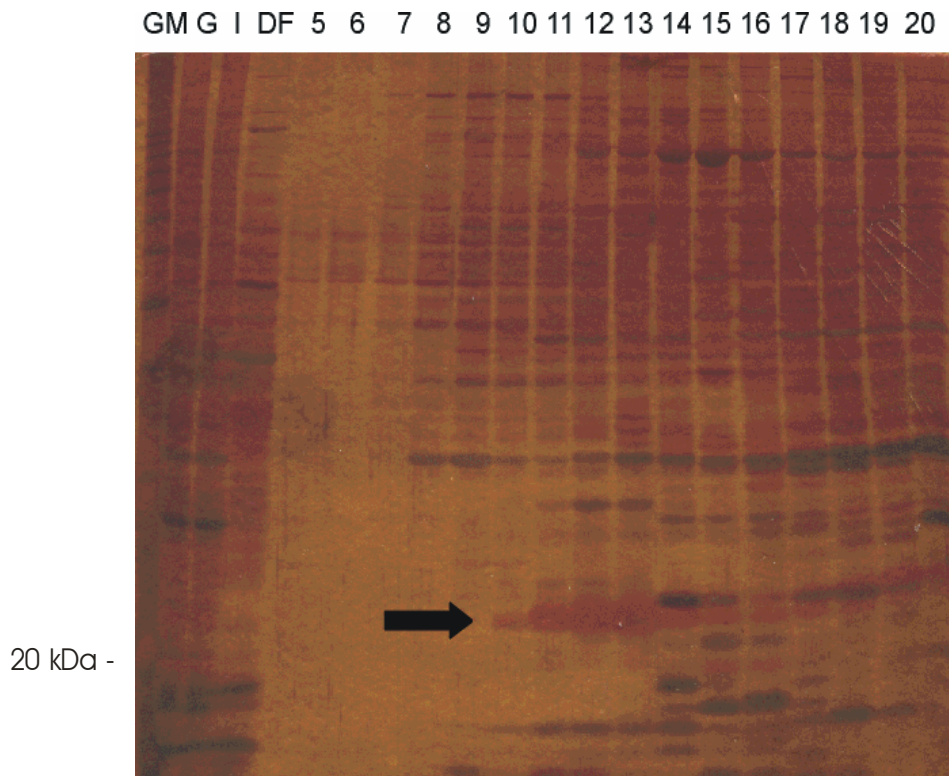
Membranlösung des mRas durch Zugabe von Puffer A (40 mM n-OG) und 20-minütigem Rühren. Nach Auftragen sich entsprechender Mengen auf ein Elektrophoresegel zeigte sich im Western Blot, dass sich nur ein kleiner Teil des mRas im Überstand befand, während in den Membranbruchstücken noch große Mengen an Ras enthalten sind.



Die Membranlösung des mRas konnte durch Verdoppelung der Inkubationszeit (40 min) etwas verbessert werden, dennoch blieb auch hier ein relativ großer Anteil im Pellet. Eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit zeigte dagegen keine wesentliche Steigerung der Membranlösung. Versuche zur Erhöhung der Konzentration von n-Octylglucosid in Puffer A wurden nicht unternommen, denn eigentlich sollte eine ausreichende Wirkung schon bei 20 mM auftreten. Ganz entscheidend schien an dieser Stelle das sehr energische Rühren der Lösung und eine vorherige manuelle Lösung von großen Pelletklumpen.

Nach dem Auswaschen des modifizierten Ras aus der Membran und Entfernung der restlichen korpuskulären Anteile durch eine erneute Zentrifugation erfolgte die weitere Aufreinigung durch eine Anionenaustauschersäule und einer Gelfiltration (Abb. 9 und 10).

a.)



b.)

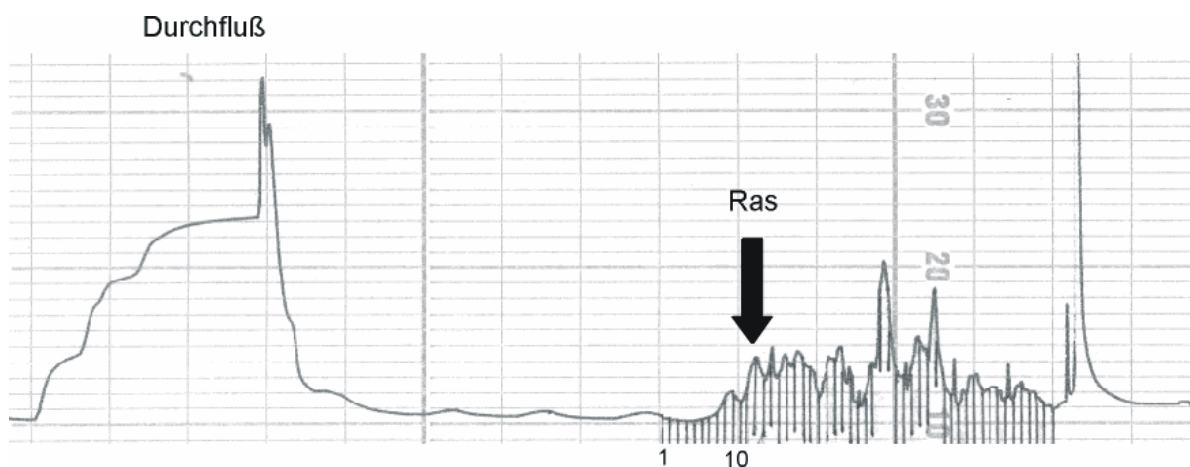


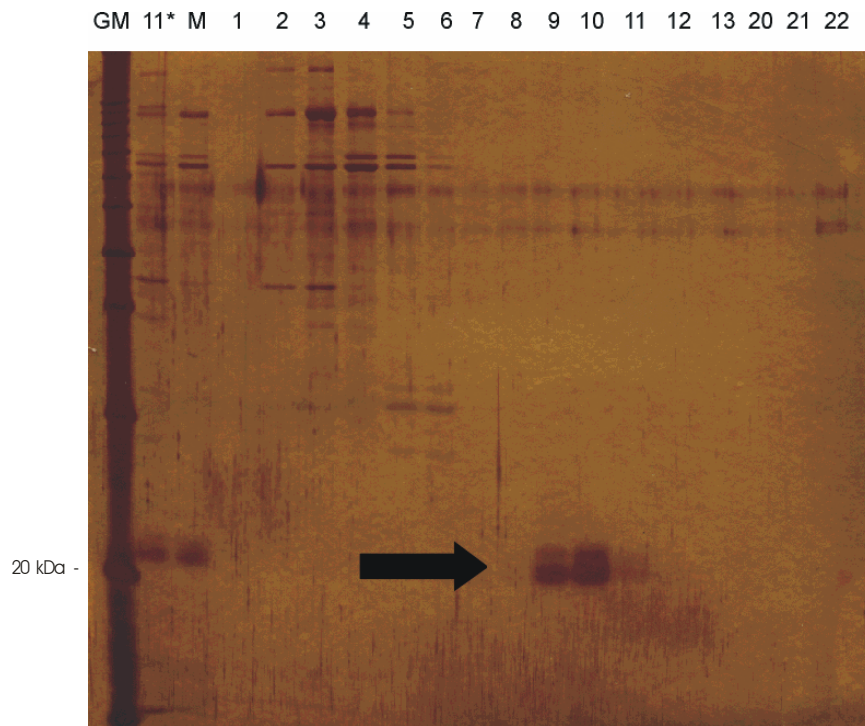
Abb.9: Aufreinigung des mRas mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule

a.) Nach der Reinigung durch den Sartorius-Filter wurde die Probe auf die MonoQ mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 2ml/min geladen. Die Fraktionen (2 ml) wurden anschließend durch eine Silbergefärbung, bzw. Western Blot sichtbar gemacht.

GM = Gibco Marker, G = Überstand nach zweimaligem Waschen der Membranbruchstücke, I = Überstand nach Membranlösung des mRas, 5 – 20 = Fraktionen nach der Anionenaustauschersäule, Pfeil = Ras-Banden.

b.) Ausdruck während des Laufs über die MonoQ. Die einzelnen Fraktionen sind durch senkrechte Linien gekennzeichnet. Pfeil = Elutionsstart von Ras.

a.)



b.)

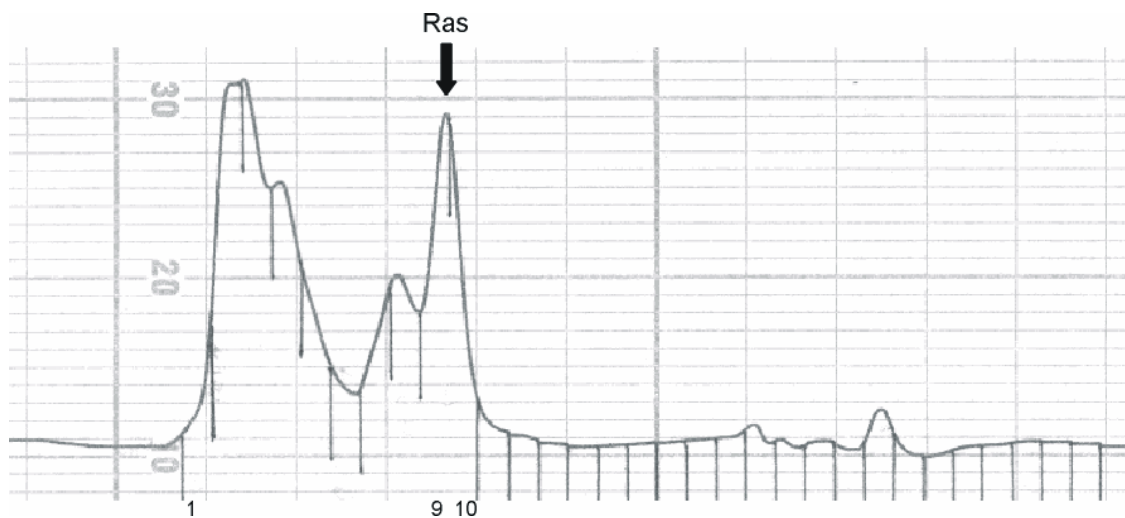


Abb.10: Aufreinigung des mRas mit Hilfe der Gelfiltration

- a.) Nach der Anionenaustauschersäule und der Mikrokonzentration der Ras-haltigen Fraktionen schloss sich eine Gelfiltration an. GM = Gibco Marker, 11* = Fraktion 11 der MonoQ, M = Retentat der Mikrokonzentration, 1 – 22 = Fraktionen der Gelfiltration, Pfeil = Ras-Banden.
- b.) Ausdruck der Gelfiltration. Die einzelnen Fraktionen sind durch die senkrechten Linien gekennzeichnet. Pfeil = Elutionsstart von Ras.

Im Anschluss an die Anionenaustauschersäule erwies sich die Mikrokonzentration der gepoolten Proben als ebenfalls problematisch. Wie im folgenden Western Blot (Abb. 11) zu sehen, ist eine nicht unerhebliche Menge von modifiziertem Ras in dem Filtrat enthalten.

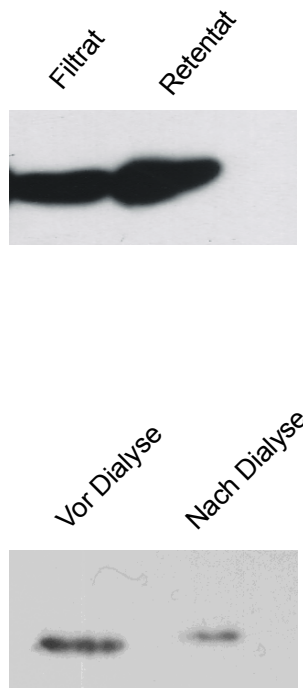


Abb.11: Ras Verlust durch Mikrokonzentration und Dialyse

Nach der Anionenaustauschersäule erfolgte die Aufkonzentration durch einen Mikrokonzentrator von Millipore. Anschließend folgte die Gelfiltration und eine Dialyse. Es wurden jeweils sich entsprechende Mengen vor und nach Mikrokonzentration und vor und nach Dialyse im Western Blot nach Ras analysiert. Durch die Mikrokonzentration ging ein Teil des Ras über das Filtrat verloren, ebenso ging ein nicht unerheblicher Ras – Anteil durch die Dialyse verloren.

Ähnlich war das Ergebnis bei Kontrolle der Proben vor und nach Dialyse (Abb. 11). Diese wurde zu Beginn noch nach der Gelfiltration durchgeführt um die Ras-Fractionen in einem Puffer mit 50% Glycerol gekühlt aufbewahren zu können. Nachdem sich jedoch dieser Ras-Verlust zeigte, wurde auf den Arbeitsschritt verzichtet und die Ras-Fractionen direkt im S75-Puffer aufbewahrt.

5.2 Modifiziertes Ras bindet an p110 γ in einer GTP- und GDP-unabhängigen Weise

Als nächstes wurde das Bindungsverhalten von posttranslational modifiziertem und unmodifiziertem Ras, abhängig von GTP und GDP, verglichen. Zu diesem Zweck wurde mRas, bzw. uRas mit Guaninnukleotiden beladen und GST-p110 γ , bzw. Deletionsmutanten hinzugefügt. Abb. 13 zeigt eine schematische Darstellung der zu diesem Zwecke verwendeten Mutanten. Der rote Abschnitt stellt eine homologe Region zur Ras-Bindungsstelle der p110 α dar (Rodriguez-Viciano, P, 1996).

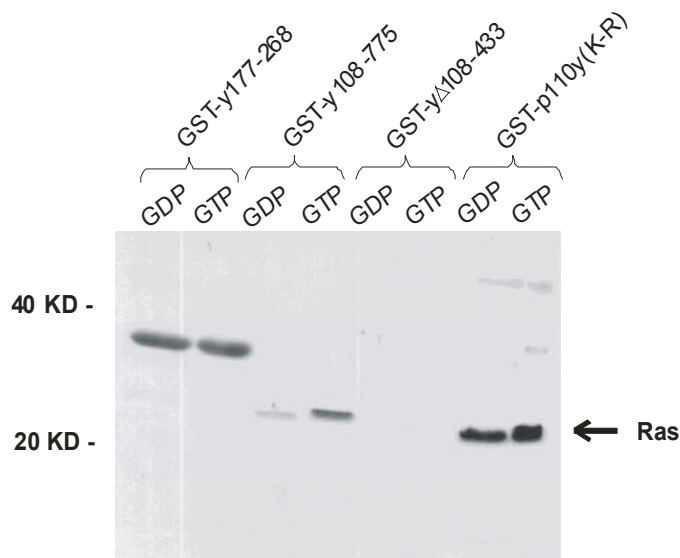
Die Ansätze mit modifiziertem Ras enthielten PBS-Puffer mit 30mM n-Octylglucosid (nicht bei den Waschvorgängen) um das mRas in Lösung zu halten.

In Abb. 12 sind die Ergebnisse dargestellt. Unmodifiziertes Ras bindet in Abhängigkeit von GTP an GST- γ 1-775 und GST-p110 γ (K \rightarrow R). uRas scheint also in GTP-gebundenem Zustand aktiv zu sein. Im Gegensatz dazu zeigt mRas sowohl in GDP-, als auch in GTP-gebundener Form eine Bindung an p110 γ (GST- γ 1-775 und GST-p110 γ (K \rightarrow R)). Der Mechanismus GTP = aktiver Zustand, GDP = inaktiver Zustand scheint hier aufgehoben zu sein. Auch bei GST- γ 177-268 sind Banden sichtbar. Hierbei handelt es sich vermutlich um eine unspezifische Reaktion zwischen GST- γ 177-268 und Anti-Ras, das würde auch mit dem Molekulargewicht übereinstimmen.

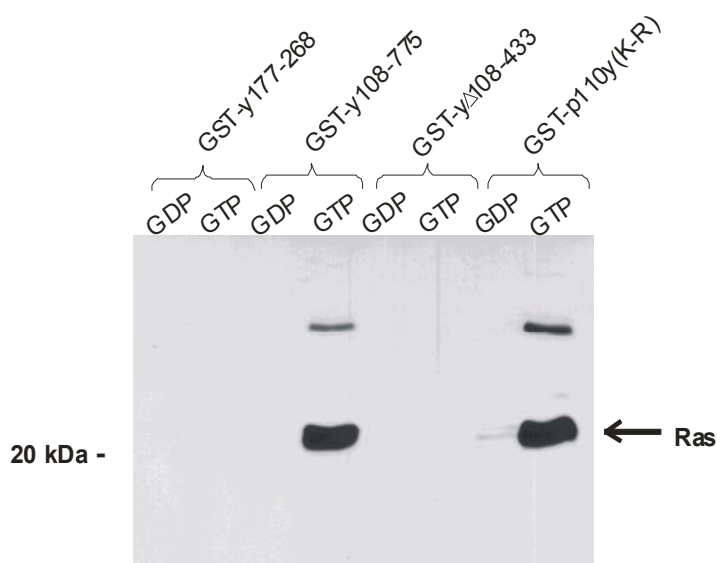
Abb.12: In vitro Bindungsversuche von mRas und uRas in Abhängigkeit von GTP und GDP

Nukleotidbeladenes mRas und uRas (siehe Pfeile) wurden mit Mutanten der GST-p110 γ inkubiert. Während uRas nur mit GTP an die PI3K γ bindet, zeigt sich, dass mRas sowohl bei Ladung mit GTP, als auch mit GDP an p110 γ bindet. Bei den beiden Banden mRas / GST-y177-268 handelt es sich um unspezifische Reaktionen des Antikörpers mit GST.

Modifiziertes Ras



Unmodifiziertes Ras

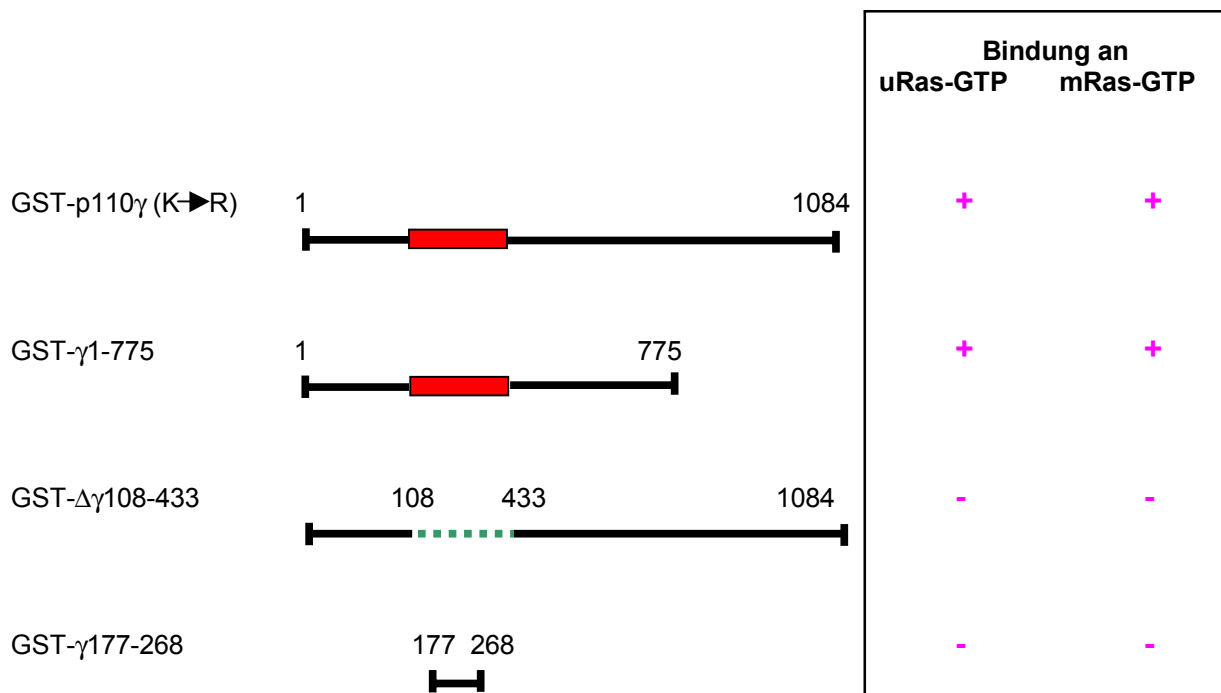


5.3 Untersuchungen zur Ras-Bindungsstelle an p110 γ

Um die Bindungsstelle des modifizierten Ras an p110 γ näher zu charakterisieren wurden *in vitro* Bindungsversuche mit verschiedenen Mutanten der PI3K γ (siehe Kapitel 5.2) unternommen. Abb. 13 zeigt eine schematische Darstellung der zu diesem Zwecke verwendeten Mutanten. Der rote Abschnitt stellt eine homologe Region zur Ras-Bindungsstelle der p110 α dar (Rodriguez-Viciana, P, 1996). Gewonnen wurden sie aus mit entsprechend Baculovirus infizierten SF9-Zellen. Sowohl modifiziertes als auch unmodifiziertes Ras binden an GST-p110 γ (K \rightarrow R) und GST- γ 1-775. Dagegen zeigt sich keine Bindung bei GST- γ Δ 108-433 und GST- γ 177-268. Offensichtlich spielt die N-terminale Region der Aminosäuren 108 – 433 eine wichtige Rolle bei der Bindung an Ras-GTP, denn bei der entsprechenden Deletion ist keine Bindung möglich.

Abb.13: Zusammenfassung der Ergebnisse zur Ras/p110 γ Interaktion

Der rote Abschnitt stellt die homologe Region zur Ras-Bindungsstelle der p110 α und β dar. Gezeigt wird die Bindung von modifiziertem und unmodifiziertem Ras an Deletionsmutanten der p110 γ .



5.4 p110 γ -Aktivität wird durch Ras nicht gesteigert

In *in vitro*-Bindungsversuchen wurde die Abhängigkeit der p110 γ -Kinaseaktivität von der Bindung an Ras-GDP und Ras-GTP untersucht. Dazu wurden die Ras-Proteine mit den Nukleotiden beladen und mit GST-p110 γ inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz nur mit GST-p110 γ und zwei Ansätze nur mit nukleotidbeladenem Ras. Nach Beigabe von GSH-Sepharose sowie von radioaktiv markiertem ATP, wurde die Bildung der Ras-PI3K-Komplexe und eine eventuell daraus resultierende Steigerung der Kinaseaktivität über ihre Fähigkeit Phosphatidylinositol (PI) zu Phosphatidylinositol3-Phosphat (PIP₃) zu phosphorylieren, gemessen.

Das Ergebnis wird grafisch in Abbildung 14 dargestellt. Eine Bindung der p110 γ an nukleotidbeladenes Ras ergibt im Vergleich zu den negativen Kontrollen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Kinaseaktivität. Es fällt auf, dass die Kinaseaktivität in den letzten beiden Ansätzen (ohne p110 γ) gering höher ist als in dem Ansatz nur mit p110 γ . Als Ursache kommen technische Defekte in Betracht oder, dass das aufgereinigte Ras aus den SF9-Zellen geringe Mengen an p110 γ oder anderen PI3K Isoformen beinhaltet. Aus Zeitgründen wurde dies jedoch nicht näher verfolgt.

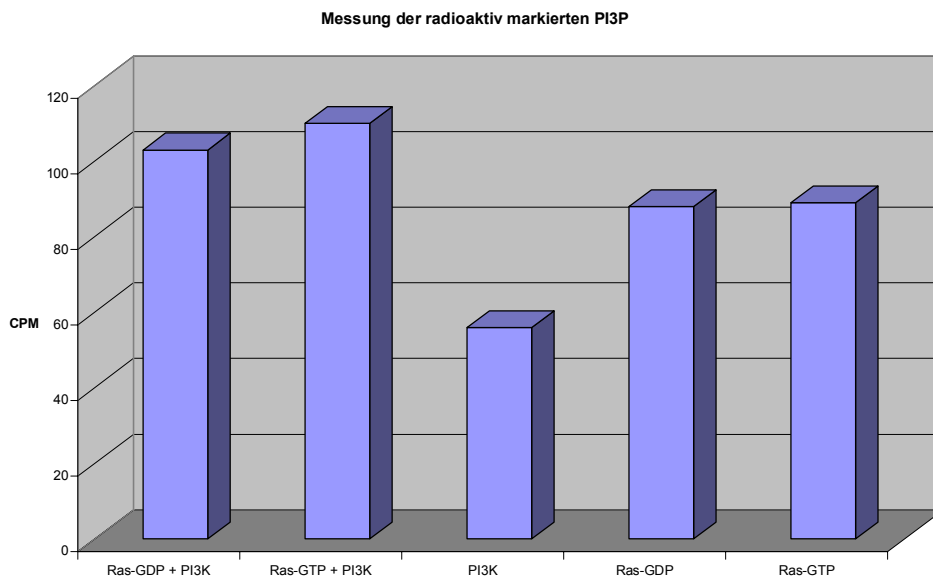
In einem weiteren Versuch wurde die Kinaseaktivität ebenfalls in Abhängigkeit von Ras-GDP und Ras-GTP gemessen, allerdings mit steigenden Konzentrationen von GST-p110 γ (0 M, 50 nM, 200 nM, 500 nM, 1 μ M und 2 μ M). Für das Waschen wurden ebenfalls GSH-Sepharose beads verwendet. Es zeigte sich ebenfalls keine wesentliche Änderung der Aktivität der PI3K γ .

Bei beiden Bindungsversuchen ist die Änderung der Enzymaktivität unter Anwesenheit von nukleotidbeladenem Ras also nicht signifikant genug, als dass von einer Ras-bedingten Enzymaktivierung die Rede sein könnte. Die gleichen Ergebnisse brachte auch ein Experiment, bei dem das Substrat Phosphatidylinositol in Liposomen dargeboten wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Das deckt sich mit den Arbeiten von Rubio und Mitarbeitern (Rubio, I, 1997), die auch in *in vivo* - Bindungsversuchen mit COS-7 Zellen nachweisen konnten, dass die Ras-Bindung an PI3K γ zu keiner signifikanter Erhöhung der Enzymaktivität führt. In Bezug auf die Regulation zeigt damit die PI3K γ einen wesentlichen Unterschied zur PI3K α . Diese

scheint sowohl in vitro (Rodriguez-Viciano, P, 1996) (Kodaki, T, 1994), als in vivo (Rodriguez-Viciano, P, 1996) positiv durch das Ras reguliert zu werden.

Abb.14: Grafische Darstellung der Aktivität der PI3 Kinase

Bei in vitro-Bindungsversuchen mit nukleotidbeladenem Ras, PI3K γ und GSH-Sepharose wurde die Kinaseaktivität der PI3K γ in Abhängigkeit von der Ras-Bindung abgeschätzt. Es erfolgte eine szintillatorische Messung des entstandenen, radioaktiv markierten PI3P.



5.5 PI3K γ mobilisiert mRas nicht aus der Membran

Da das Ras die PI3 Kinase offensichtlich nicht aktiviert, bestand eine weitere Möglichkeit der Wechselwirkung zwischen dem Enzym und dem Protein darin, dass das modifizierte Ras, das über seinen Lipidrest in den Zellmembranen verankert ist, durch die PI3K in das Cytosol mobilisiert wird. Um dies zu untersuchen wurden *in vitro* Experimente mit Membranbruchstücken von Baculovirus-infizierten SF 9-Zellen durchgeführt. Das Pellet von Membranbruchstücken erhält man gemäß dem Verfahren der mRas-Aufreinigung.

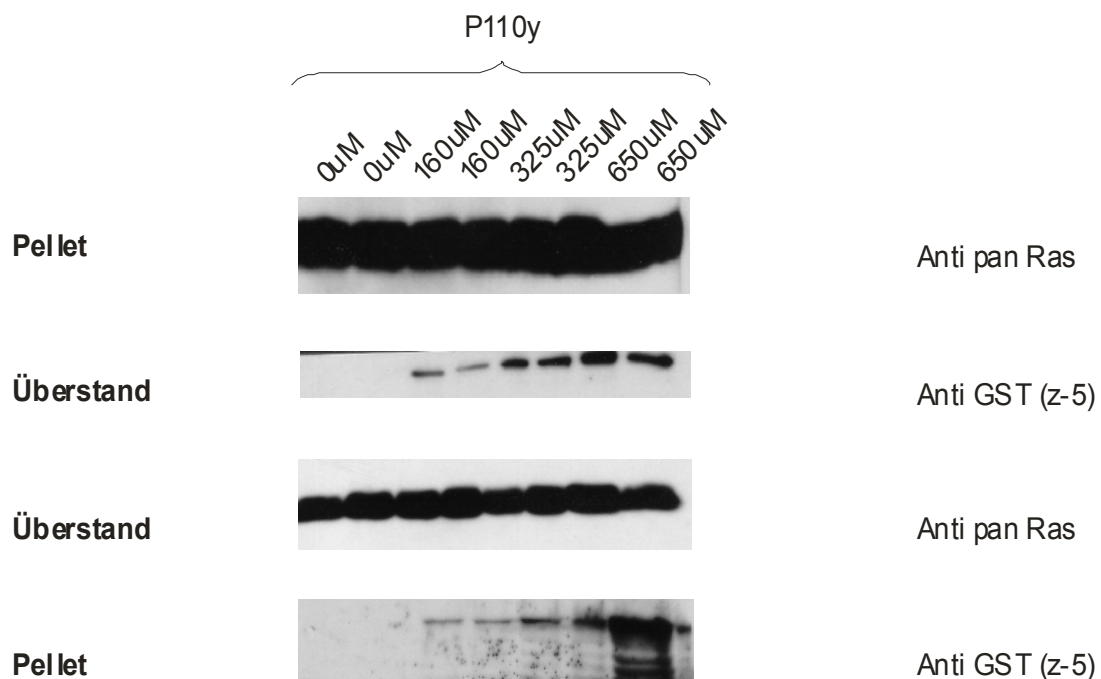


Abb.15: PI3K γ löst membrangebundenes Ras nicht aus der Membran.

Durchgeführt wurden die *in vitro* Experimente mit Membranbruchstücke von SF9-Zellen. In allen Ansätzen enthält das Pellet annähernd gleich viel membrangebundenes Ras. Trotz Zugabe steigender Mengen an GST-p110 γ ist anschließend die Menge an gelöstem Ras im Überstand in allen Ansätzen annähernd gleich. Auch ohne Zugabe von GST-p110 γ ist gelöstes Ras in den Überständen enthalten.

Nach dem Waschvorgang wurde mit Waschpuffer eine Suspension an Membranbruchstücken hergestellt. Alle acht Ansätze enthalten wie in Abb. 15 sichtbar gleich große Ras-Mengen. Anschließend wurden steigende Mengen an PI3K γ hinzugefügt (0 M, 160 μ M, 325 μ M und 650 μ M). Bei einer Mobilisierung des modifizierten Ras aus der Zellmembran heraus müssten im Überstand ansteigende Mengen von gelöstem Ras sichtbar sein. Stattdessen findet man annähernd gleich viel Ras im Überstand, sogar in den Ansätzen, die keine PI3K γ enthalten. Vermutlich handelt es sich um eine unspezifische Lösung des Ras aus den Membranbruchstücken. Jedenfalls wird deutlich, dass die PI3K nicht modifiziertes Ras aus der Zellmembran in das Cytosol, bzw. in den Überstand mobilisiert.

5.6 mRas mobilisiert PI3K γ nicht an die Zellmembran

Bei den Versuchen zur Ras-Mobilisierung in das Cytosol durch die PI3K fiel in den Western Blots auf, dass sich bei den Bruchstücken von Zellmembranen geringe Mengen von GST-p110 γ fanden (Abb. 15). Folglich wurde die Frage aufgeworfen, ob die PI3K γ durch das membrangebundene, modifizierte Ras zur Zellmembran und damit zu seinen Substraten gebracht wird. Deswegen wurden noch mal Versuche mit SF9-Membranen aus Zellen mit mRas-Überexpression durchgeführt, dieses Mal jedoch mit einer dominant negativen Form des Ras, Ras A38. Hierbei handelt es sich um eine Ras-Mutante, die zwar GDP/GTP binden kann, jedoch nicht an p110 γ bindet (Rubio, I, 1997b). Zu der Suspension mit Membranbruchstücken wurde GST-p110 γ hinzugefügt. Wie in Abb. 16 sichtbar, fand sich auch in diesen Fällen GST-PI3 Kinase zwischen den Membranbruchstücken. Da aufgrund der Mutation keine Bindung zwischen dem mRas und dem Enzym stattfinden konnte, handelt es sich also lediglich um eine unspezifische Anlagerung der PI3K an die Membranbruchstücke. Das bedeutet, dass das mRas die PI3K nicht zur Zellmembran führt.

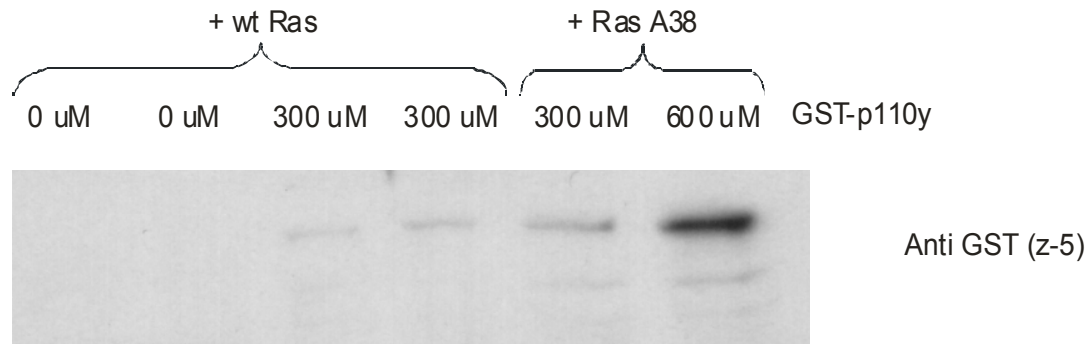


Abb. 16: PI3K γ wird durch mRas nicht an die Zellmembran mobilisiert.

In die Suspensionen von A38 Ras- / wtRas – Membranbruchstücke (jeweils gleiche Mengen) wird p110 γ in einer Menge von 0, 300 und 600 uM hinzugefügt. Nach der Zentrifugation lies sich ein geringer Gehalt an cytosolischer p110 γ im Membranpellet nachweisen. Da A38 Ras eine Mutante ist, die nicht an p110 γ bindet, kann es sich dabei also nur um eine unspezifische Anlagerung von p110 γ an die Membranbruchstücke handeln.

5.7 Farnesylierung wird für die Ras-Bindung an p110 γ benötigt

Wie bereits in *in vitro* Experimenten gezeigt, scheint das modifizierte Ras im Gegensatz zu dem unmodifizierten Ras unabhängig von der Nukleotidbeladung an p110 γ zu binden. Nun sollte der Modifikationsgrad des Ras, welches *in vivo* an p110 γ bindet, näher untersucht werden. Dazu wurden SF9-Zellen sowohl mit wtRas, als auch mit p110 γ infiziert. Es wurde der Effekt verschiedener Inhibitoren der Ras-Modifizierung getestet:

Ein Inhibitor ist das Mevastatin, auch als Compactin bekannt. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Hemmstoff der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, ein Enzym der Cholesterol Biosynthese (Rubio, I, 1997). Die Synthese von Polyisopren-Vorläufern, die für die Proteinprenylierung benötigt werden, wird dadurch gehemmt. Ein weiterer Stoff ist das FPT III. Es inhibiert die kovalente

Bindung des Prenylrestes und somit die Farnesylierung des Ras. Etwas höher im Bereich der Modifizierung setzt das FTS ein, es verhindert die Methylierung der Carboxylgruppe des Ras.

Wie in Abb. 17 ersichtlich wird die Komplexbildung von p110 γ und dem wtRas sowohl durch Mevastatin, als auch durch FPT III unterdrückt. Dagegen ist die Komplexbildung unter dem Inhibitor FTS zwar etwas vermindert im Vergleich zur Kontrolle ohne Inhibitor, dennoch ist sie deutlich nachweisbar. Dies deutet an, dass die Farnesylierung des Ras-Proteins der entscheidende Schritt für die Bindung an p110 γ ist.

Bei den Zell-Lysaten fällt neben der deutlich schwächeren weiter wandernden Bande des modifizierten Ras als Zeichen der Modifizierungshemmung durch die Inhibitoren ein Fehlen der Obersten der drei Ras-Banden bei der EGTA- und der EDTA-Lyse auf. Offensichtlich handelt es sich dabei um eine Ras-Form, deren Bildung durch Entzug von Calcium- und Magnesium-Ionen gehemmt wird.

Unter der EDTA-Lyse zeigte sich wiederholt eine verstärkte Bindung von modifiziertem Ras an p110 γ , die sich unter EGTA-Lyse nicht feststellen lässt. Eine mögliche Erklärung könnte die von der Nukleotidbindung unabhängige Komplexbildung des modifizierten Ras mit p110 γ sein. Dies zeigte sich schon in vorherigen Versuchen (siehe 5.3). Es wäre auch denkbar, dass durch den Entzug von Magnesium Phosphorylierungsvorgänge der PI3K verhindert werden.

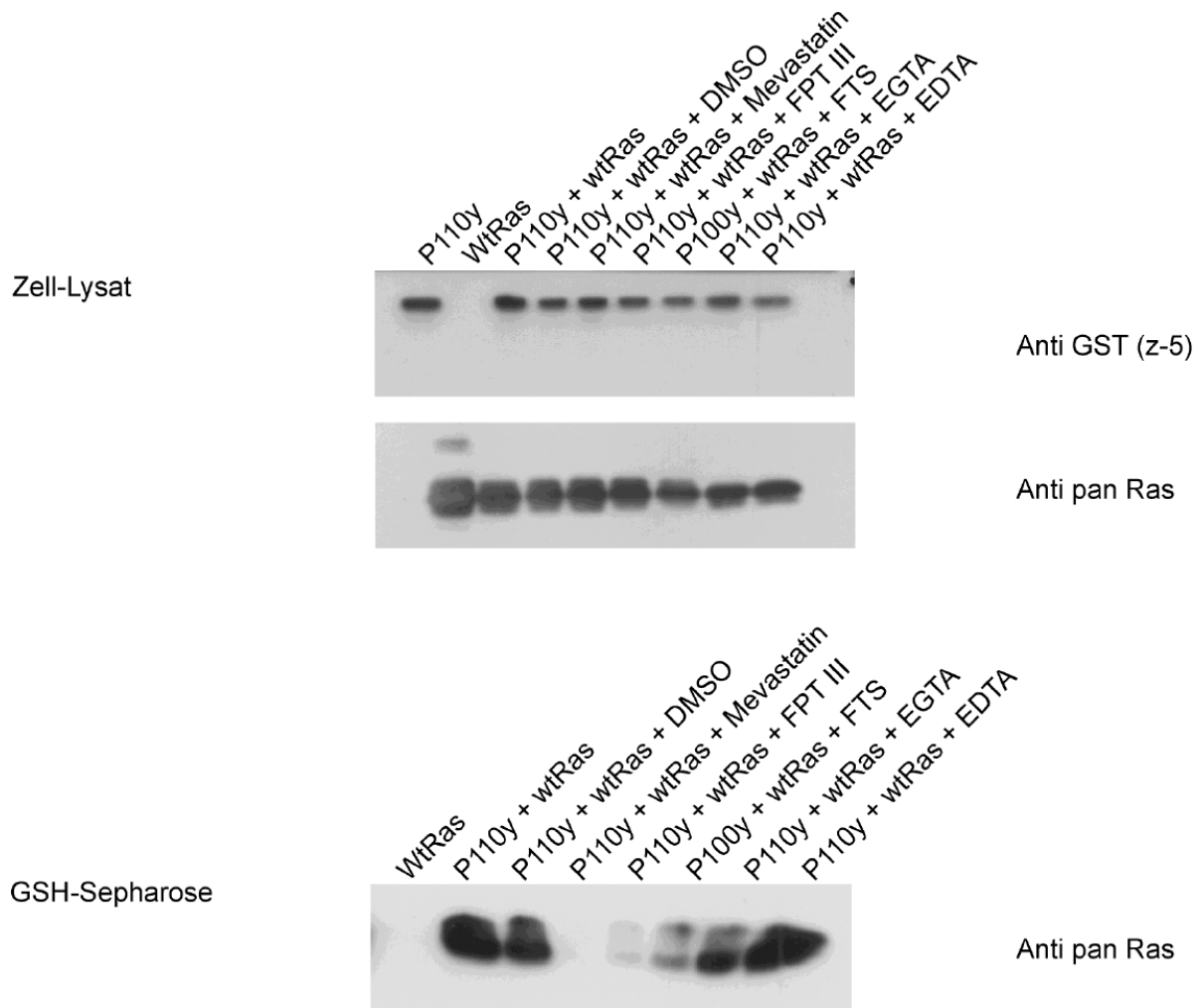


Abb. 17: Farnesylierung wird für die Ras-Bindung an p110 γ benötigt

SF9-Zellen wurden mit wtRas- und p110 γ -Baculoviren infiziert und mit 25 μ M Mevastatin, 100 μ M FPT III, 25 μ M FTS oder DMSO behandelt. GST-p110 γ wurde mit GSH-Sepharose präzipitiert und gebundenes Ras durch Western Blot sichtbar gemacht.

5.8 EDTA beeinflusst die Ras-Modifizierung und die mRas-Bindung an p110 γ

In den *in vitro* Bindungsversuchen unter Einfluss verschiedener Inhibitoren der Ras-Modifizierung (siehe Kapitel 5.7) fielen zwei Dinge auf: Erstens zeigte sich unter der EDTA-Lyse eine vermehrte Bindung von modifiziertem Ras an p110 γ . Zweitens fiel ein Fehlen der obersten Ras-Bande auf, sowohl unter EDTA-, als auch unter EGTA-Lyse. Aus diesem Grund wurde der Einfluss des EDTA, bzw. des Entzuges von Calcium- und Magnesium-Ionen, näher untersucht. Ähnlich den vorherigen Experimenten wurden *in vitro* Bindungsversuche mit p110 γ und verschiedenen Ras-Mutanten mit und ohne EDTA-Lyse (Lyse-Puffer mit 10 mM EDTA) durchgeführt. Verwendet wurden dabei V12-Ras, eine Mutante ohne GTPase-Aktivität, d.h. eine dominant aktive Form. V12/S186, eine Ras-Mutante, der die Aminosäure 186 (Cystin) fehlt und daher nicht farnesyliert werden kann. Und V12/S181/184, bei dem die Aminosäuren 181 und 184 ausgetauscht worden sind, wodurch das Protein nicht palmitoyliert werden kann. Dies zeigt sich auch in dem Western Blot der Zelllysate (Abb. 18): Während bei V12/S181/S184 modifiziertes Ras sichtbar in Form der untersten Ras-Bande sichtbar ist, findet man bei V12/S186 nur die Bande des unmodifizierten Ras.

Die vorherigen Ergebnisse wurden bestätigt: Ohne EDTA-Lyse treten bei den Zelllysaten drei Ras-Banden auf: die unterste Bande für eine modifizierte Rasform, die Mittlere für das unmodifizierte Ras und eine obere Bande, bei der es sich um eine weitere Stufe der Ras-Modifizierung handeln könnte oder aber um ein Abbauprodukt des Ras. Auffällig ist, dass diese oberste Bande nicht unter Einfluss des EDTA auftritt.

Die Komplexbildung zwischen Ras und p110 γ wird wie in den vorherigen Experimenten durch die Präzipitation mit GSH-Sepharose beads und anschließendem Western Blot sichtbar gemacht. Es fällt eine verstärkte mRas-Bindung an p110 γ unter dem Einfluss von EDTA auf (Abb.18). Normalerweise werden für Nukleotidbindung an das Ras-Protein Magnesium-Ionen benötigt, damit sich die negativen Gruppen des Ras und die negativen Gruppen von GDP/GTP nicht abstoßen. Unter EDTA-Lyse dürfte Ras also weder an GDP, noch an GTP gebunden sein, trotzdem wird vor allem modifiziertes Ras gebunden. Offensichtlich ist mRas also nicht nur unabhängig von einer GTP-Bindung (im Gegensatz zu

unmodifiziertem Ras, das in GDP-gebundener Form inaktiv ist – siehe Kap. 5.4), sondern unabhängig von jeder Nukleotidbindung.

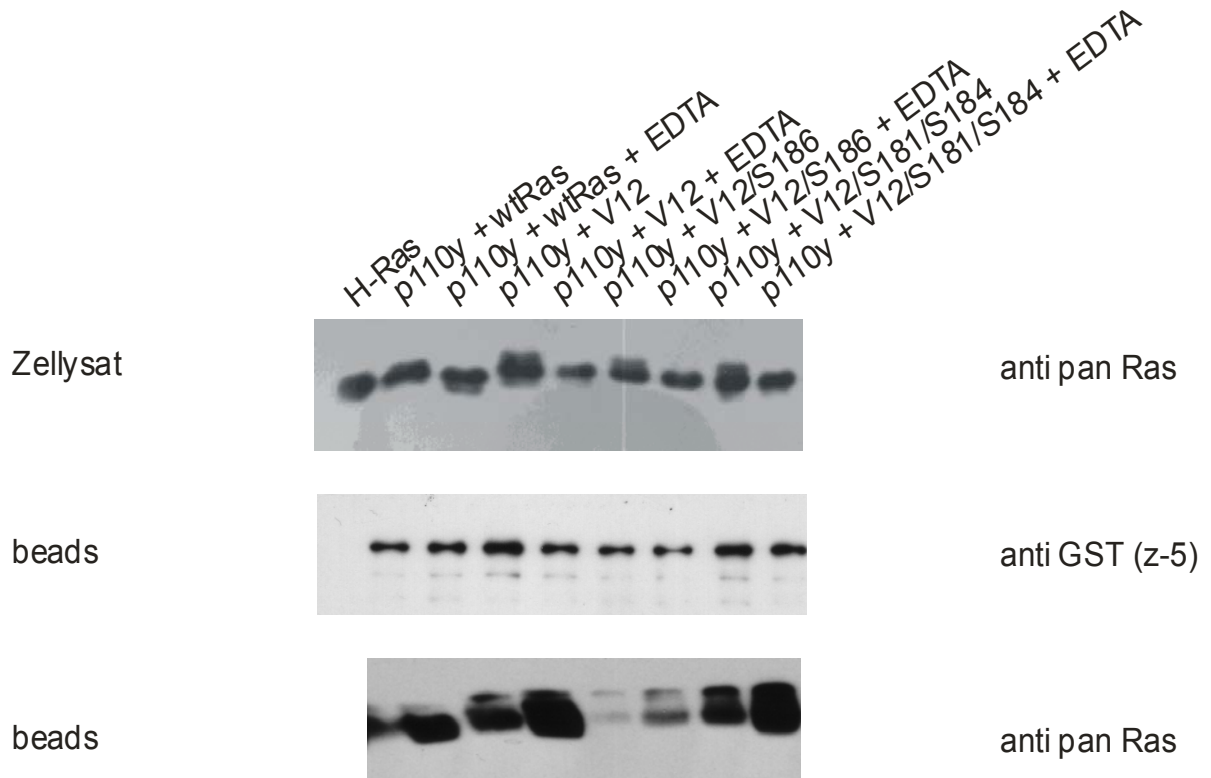


Abb. 18: Der Einfluss von EDTA auf die Ras-Modifizierung und die Komplexbildung mit p110 γ

Es handelt sich hierbei um in vitro Bindungsversuche zwischen p110 γ und Ras, bzw. verschiedenen Ras-Mutanten in Abhängigkeit von einem EDTA-haltigen Lyse-Puffer. Unter dem Einfluss von EDTA fehlt die oberste Ras-Bande in den Zellysaten und die Komplexbildung mit modifiziertem Ras wird gesteigert.

6. Diskussion

Die GTPasen der Ras-Superfamilie bilden mit ihren Effektoren ein kompliziertes Netzwerk von Signalübertragungswegen. Unter anderem scheint dabei die Familie der Phosphoinositid 3-Kinasen beteiligt zu sein. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die zur Phosphorylierung des Inositolringes von Phosphoinositiden in Position 3 befähigt sind. Nach PI3K α und β (Hiles, ID, 1992) wurde 1995 von Stoyanov *et al.* die Phosphoinositid 3-Kinase γ entdeckt (Stoyanov, B, 1995). 1997 wurde die Existenz eines weiteren Heterodimers bekannt, die p110 δ (Vanhaesenbroeck, B, 1997). Im Gegensatz zu den Isoformen α , β und δ fehlt bei der PI3 Kinase γ die Regulatoruntereinheit p85 (Stoyanov, B, 1995) (Rubio, I, 1997).

Schon früh wurde eine direkte Interaktion zwischen Ras-GTP und der α -/ β -Isoform nachgewiesen. Diese führt zu einer Steigerung der Enzymaktivität, bzw. zur Bildung von PI(3,4,5)P3 (Rodriguez-Viciano, P, 1994) (Rodriguez-Viciano, P, 1996) (Kodaki, T., 1994). Die Annahme, auch die γ -Isoform könnte an das Ras-Protein binden, lag daher nahe. Ein Aspekt, der hier näher untersucht werden sollte.

Für *in vitro* Bindungsversuche mit der PI3K γ musste Ras aus SF9-Zellen aufgereinigt werden. Zunächst erfolgte dieser Vorgang wie von Page *et al.* 1989 beschrieben (Page, MJ, 1989). Um den Proteinverlust während der Aufreinigung möglichst gering zu halten, wurden einzelne Arbeitsschritte untersucht und entsprechende Veränderungen vorgenommen. Wichtig war vor allem die Trennung von modifiziertem (mit Lipidrest) und unmodifiziertem (ohne Lipidrest) Ras um die unterschiedlichen biologischen Funktionen dieser Proteinformen untersuchen zu können. Die Ras-Proteine besitzen am carboxyterminalen Ende ein CAAX-Motiv (C = Cystein, A = aliphatische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure, bei Ras häufig Serin oder Threonin), das in fast allen Proteinen der Ras-Superfamilie und ebenso in vielen anderen membranassoziierten Proteinen gefunden wird (Hancock, JF, 1990) (Hancock, JF, 2003). Das Cystein an Position 186 wird durch eine Farnesyltransferase farnesyliert, dabei wird die Farnesylgruppe durch den Mevalonat-Cholesterol-Syntheseweg bereitgestellt. Anschließend werden die drei letzten Aminosäuren proteolytisch abgespalten. Das nahe Carboxylende wird carboxymethyliert (Gutierrez, L, 1989) (Hrcycyna, CA, 1991). Der vierte und letzte

Schritt besteht aus einer Palmitoylierung von Cysteinen (Cys 181 und 184) innerhalb einer hypervariablen Region (AS 165 – 185) (Hancock, JF, 1990) (Hancock, JF, 2003). Während die Farnesylierung und die Proteolyse in den Zellen irreversibel sind, können die Methylierung und Palmitoylierung rückgängig gemacht werden (Abb.2) (Rubio, I, 1997). Im Gegensatz zu H-, K(A)- und N-Ras, besitzt das K-Ras (B) keine Cysteine innerhalb der hypervariablen Domäne, so dass keine Palmitoylierung stattfinden kann. Es enthält stattdessen sechs Lysinreste (AS 175 – 180), die sich für die Membranbindung von K-Ras (B) als essentiell erwiesen (Gutierrez, L, 1989) (Hancock, J F, 1990) (Hrcycyna, CA, 1991).

Jeder einzelne Schritt der Modifikation erhöht die Affinität des Ras zur Zellmembran. Sowohl die Farnesylgruppe, als auch die Palmitoylgruppe erhöhen die Lipophilität und auch die Methylgruppe scheint in einem gewissen Sinn das Protein lipophiler erscheinen zu lassen, indem sie an die negativ geladene Carboxylgruppe gebunden wird (Gutierrez, L, 1989) (Hancock, JF, 1989) (Hrcycyna, CA, 1991). Während das unmodifizierte Ras im Cytosol zu finden ist, ist das modifizierte Ras über den lipophilen Rest der Zellmembran angelagert. Anfangs blieb nach Eröffnen der Zellen zwischen den Membranbruchstücken unmodifiziertes Ras enthalten. Wahrscheinlich handelt es sich hierbei um eine unspezifische Anlagerung an die Membranbruchstücke. Versuche mit Western Blots zeigten, dass mindestens zwei Waschvorgänge nach Zellöffnung vorgenommen werden sollten um das unmodifizierte Ras zu entfernen (Ergebnisse nicht gezeigt).

Als besonders schwierig erwies sich der nächste Schritt: das Lösen des membrangebundenen Ras aus seiner Verankerung. Dies erfolgte mittels eines Detergenz: Puffer A mit 40 mM n-OG. Bei 20 minütiger Inkubationszeit verblieb ein großer Anteil des Proteins in der Membran (Abb.8). Verdoppelung der Inkubationszeit, sowie vorheriges manuelles Lösen von großen Pelletklumpen mit Hilfe eines Spatels und weiteres energisches Rühren verbesserten das Ergebnis, wenn auch ein Optimum sicher noch nicht erreicht ist. Hier scheint der die Endkonzentration limitierende Schritt in der Ras-Aufreinigung zu liegen. Immerhin konnten Konzentrationen von bis zu 6,8 mg/ml (Messung nach Bradford) erreicht werden. Untersuchungen zur Detergenzien-Konzentration wurden nicht unternommen, denn eine volle Wirkungsentfaltung des n-Octylglucosids sollte bereits bei 20 mM auftreten (kritische micellare Konzentration = 20mM), so dass eine Steigerung über 40 mM kein besseres Ergebnis erwarten lies.

Ein weiterer Schritt, der zu Ras-Verlusten führte, war die Mikrokonzentration im Anschluss an die Anionenaustauschersäule. Mit einer Porengröße von 5kD wäre durchaus eine Eignung für das Ras-Protein vorhanden gewesen, aber durch die Zentrifugalkräfte wurde das Protein doch durch die Poren hindurchgepresst (Abb.11). Bedauerlicherweise konnte aber auf diesen Arbeitsschritt nicht verzichtet werden, musste doch zur Ladung auf die Sephadex 75 Säule (Gelchromatografie) die Menge der gesammelten Fraktionen von mehreren Millilitern auf ca. 300 µl reduziert werden. Verzichtet wurde aber auf die Dialyse im Anschluss an die Gelfiltration, denn auch hier ging ein nicht unerheblicher Teil des Proteins verloren. So wurde das aufgereinigte Ras also nicht in 50% Glycerol bei - 20 °C gelagert, sondern direkt im S75 Puffer bei - 80 °C. Hinweise für einen Funktionsverlust bei Lagerung in diesem Puffer gab es nicht.

Um nun den Einfluss der Ras-Modifizierung auf die p110 γ -Bindung zu untersuchen, wurden *in vitro* - Bindungsversuche mit uHa-Ras oder mHa-Ras und GST-Fusionsproteine der p110 γ durchgeführt. Wie in Abb. 12 dargestellt band unmodifiziertes Ha-Ras an die Deletionsmutanten der p110 γ nur in GTP-gebundener Form. Dagegen band posttranslational modifiziertes Ras sowohl in GTP-gebundener, als auch in GDP-gebundener Form an die Kinase. Damit steht das Ergebnis im deutlichen Gegensatz zu *in vitro* Bindungsversuchen mit p110 α , das unabhängig von der Modifizierung nur Ras-GTP bindet (Rodriguez-Viciano, P, 1996) (Rubio, I, 1997) (Downward, J, 1999). Die Spezifität dieser Bindung wurde in unserem Labor durch die Anwesenheit von drei verschiedenen Detergentien bei den Bindungsversuchen sichergestellt (Rubio, I, 1997). Ebenso wurde bei einem Experiment der Ras-Antikörper Y13-259 eingesetzt, von dem bekannt ist, dass er die Interaktion von Ras mit seinen Effektoren unterbricht (Furth, ME, 1982) (Rodriguez-Viciano, P, 1994). Entsprechend wurde hier die Interaktion der GDP- und GTP-gebundenen Form des mRas mit p110 γ unterbrochen (Rubio, I, 1997). Der nicht-neutralisierende Antikörper Y13-238 zeigte dagegen keinen Effekt. Scheinbar entsteht durch die Modifikation des Ras eine zweite Bindungsstelle für p110 γ , die unabhängig vom Nukleotidbindungsstatus des mRas funktioniert und durch Y13-259 Antikörper sterisch behindert werden kann.

Die Hypothese einer zweiten Bindungsstelle steht in Einklang mit den Ergebnissen von Rubio *et al.*, der dieselben Bindungsversuche *in vivo* in SF9-Zellen durchführte. Er wies eine erhöhte Bindungskapazität von p110 γ für modifiziertes Ras nach und

führt dies auf eine separate Bindungsstelle, die zu dieser Interaktion beiträgt, zurück. mRas-GTP zeigte sich in Bindung mit p110 γ weniger empfindlich für GAP als die unmodifizierte Variante (Rubio, I, 1999). Obwohl p110 γ an mRas-GDP bindet und in Baculovirus-infizierten SF9-Zellen der 40fache Gehalt an GDP gegenüber GTP vorhanden ist, überwiegt in SF9-Zellen Ras-GTP in Komplex mit der Lipidkinase um das 3-4fache (Rubio, I, 1997). Möglicherweise bindet p110 γ an mRas-GDP, das in den Zellen im Überschuss vorhanden ist, und wird aktiviert durch den Austausch von GDP in GTP. Das aktivierte Ras-Protein wird dann durch die Lipidkinase in seiner GTP-gebundenen Form stabilisiert. Tatsächlich konnte in mit GST-p110 γ infizierten SF9-Zellen ein Anstieg des Ras-GTP/Ras-GDP Verhältnisses verzeichnet werden (Rubio, I, 1997).

In den folgenden *in vitro* – Bindungsversuchen wurde die Bindungsstelle der PI3K γ mit dem modifizierten Ras untersucht. Nach Rodriguez-Viciano zeigen die vier Isoformen (α - δ) in ihren RBD deutliche Homologien von 15 – 30%. Fragmente der Isoformen α und β , die die Aminosäuren 133 – 314 beinhalten, sind in der Lage uRas GTP-abhängig zu binden (Rodriguez-Viciano, P, 1996). Um nun die Bindungsstelle der PI3K γ näher zu definieren wurden Deletionsmutanten der Kinase verwendet. Nach diesen Ergebnissen muss die Bindungsstelle sowohl für das modifizierte, als auch für das unmodifizierte Ras zwischen Aminosäure 1 und 775 liegen, beinhaltet also auch die Region, die in der α und β - Isoform die Bindungsstelle darstellt (siehe Abb. 13). Im Gegensatz zu der α - und β -Isoform konnten in unserem Labor jedoch keine kleineren Fragmente als AS 98 – 740 von p110 γ produziert werden, die an das Ras binden konnten (Rubio, I, 1997b). Somit wird also mehr als die Hälfte der Enzymsequenz für die GTP-abhängige Bindung am Ras benötigt. Unsere Theorie basierte darauf, dass es sich dabei wahrscheinlich nicht um eine unterschiedliche Proteininteraktionsdomäne handelt. Eher ist die RBD von p110 γ Teil einer größeren Struktureinheit. Die Deletionsmutante 1 – 399 zeigte gering gebundene Ras-Mengen, allerdings erst nach längerer Exposition des Filmes (Rubio, I, 1997b). Es könnte also zwischen AS 399 und 740 eine Domäne liegen, die direkt für die Ras-Bindung benötigt wird, oder die für die Sekundärstruktur des Fragments 1 – 399 verantwortlich ist.

In der Zwischenzeit wurde die Theorie, dass nicht eine einzige Bindungsstelle an PI3K γ für die Ras-PI3K γ -Interaktion verantwortlich ist durch Pacold *et al.* verifiziert

(Pacold, ME, 2000). Danach bindet die Switch II – Region des Ras an die katalytische Domäne der p110 γ . Und die Switch I – Region bindet an die RBD (Ras-bindende Domäne) der PI3K γ (siehe Abb.19 und 20). Durch Ras-Mutanten konnte bewiesen werden, dass beide Switch-Regionen zur PI3K γ -Bindung benötigt werden. Durch die Komplexbildung treten mehrere Konformationsänderungen auf. Die Substratbindungsstelle der PI3K weist zur Zellmembran und die C2-Domäne bindet Phospholipide. Die in der Struktur nicht aufgelöste hypervariable Region von Ras besitzt genügend Länge um die Lücke zwischen der Ras-Effektordomäne und der Farnesylverankerung zu überbrücken. Die Schleifen der katalytischen Domäne nahe der Zellmembran beinhalten basische Gruppen, die negativ geladene Gruppen und hydrophobe Anteile (der Membran) binden können und damit helfen, dass Enzym in Position zu halten. Und die Struktur zeigt, dass der gestrichelte, nicht in der Struktur definierte C-Terminus von Ras parallel zur und in unmittelbarer Nähe der Oberfläche von p110 γ in Richtung Membran laufen muss. Dies spricht stark dafür, dass an dieser Stelle eine Interaktion stattfinden könnte, wie wir sie für mRas sehen.

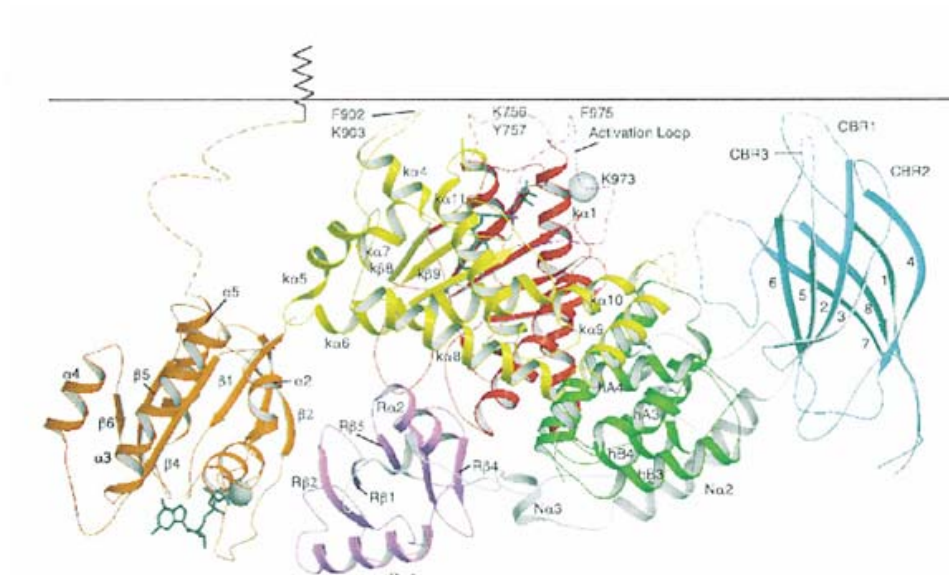


Abb.19: Ein Modell des Ras-PI3K-Komplexes an der Membranoberfläche

(Pacold, ME, 2000)

Alle Regionen, die in der Struktur nicht sichtbar sind, wurden mit gestrichelter Linie dargestellt. Lys973 markiert die substratbindende Schleife. Der C-terminale Anteil des Ras wurde modelliert, um zu zeigen, dass dieses Peptid sehr wohl in der Lage ist, die Lücke zwischen dem Ras (an RBD gebunden) und der Membranoberfläche zu überbrücken. Die Farnesylgruppe wurde schematisch dargestellt. Anteile an der Spitze der katalytischen Domäne, die potentiell mit der Zellmembran interagieren, wurden ebenfalls markiert.

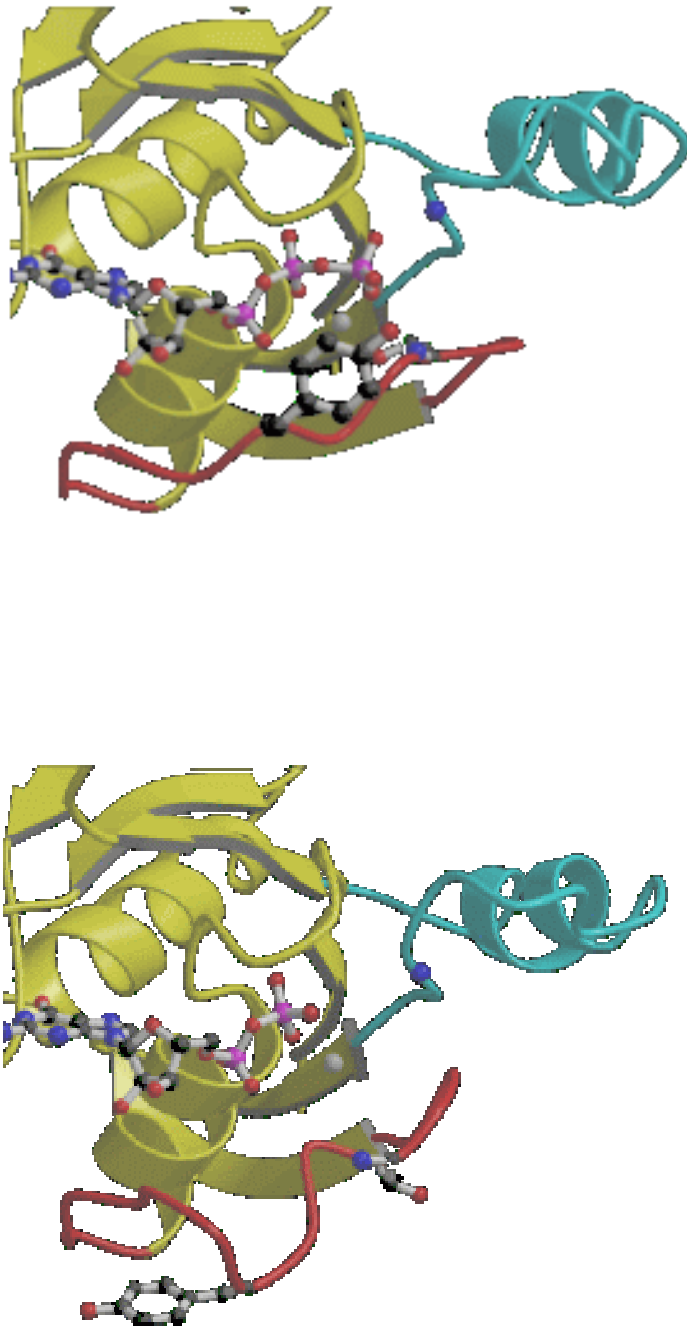


Abb.20: Konformationsänderung von Ras bei der Hydrolyse von GTP zu GDP

(MPI für molekulare Physiologie, Dortmund)

Die Switch I – Region, auch Effektorloop genannt, ist rot markiert, die zweite Region, die ebenfalls große Änderungen erfährt (Switch II) ist hellblau dargestellt. Die Gamma-Phosphatgruppe bestimmt die Struktur der flexiblen Switch-Regionen.

Von der Lipidkinase p110 α ist bekannt, dass ihre Enzymaktivität durch Ras gesteigert werden kann. In COS-7 Zellen bewirkt V12Ras bei gleichzeitiger Expression von p110 α zu einem Anstieg der PI3K Lipidprodukte (Rodriguez-Viciana, P, 1994). Dabei kann ein hemmender Effekt des Ras auf eine PI Phosphatase letztendlich nicht ausgeschlossen werden. Doch die Aktivierung der Lipidkinase durch Ras scheint einleuchtend zu sein, denn auch *in vitro* wurde ein Anstieg der Lipidkinaseprodukte auf mRas-GTP nachgewiesen (Rodriguez-Viciana, P, 1994) (Kodaki, T, 1994) (Rodriguez-Viciana, P, 1996). Diese Aktivierung ist abhängig von der Ras-Modifikation. Unmodifiziertes Ras kann keine Erhöhung der Enzymaktivität bewirken (Rodriguez-Viciana, 1996). Eine zur Membran mobilisierende Funktion des Ras für die p110 α , d.h. eine Mobilisierung der Lipidkinase zu seinem Substrat, wäre denkbar. Andererseits machen die Autoren selbst eine Konformationsänderung der Lipidkinase dafür verantwortlich.

Es stellte sich nun jedenfalls die Frage, ob eine Aktivierung der Lipidkinaseaktivität durch Ras auch bei p110 γ nachgewiesen werden kann. In den *in vitro* Bindungsversuchen mit mRas-GDP und mRas-GTP war dies nicht der Fall (Abb. 14). Auch ein Substratangebot in Liposomen zur Nachahmung zellulärer Verhältnisse zeigte keine Änderung. Somit zeigt sich auch hier ein deutlicher Unterschied zu p110 α . Die Ergebnisse werden gestützt durch Rubio *et al.*, der in Cos7-Zellen bei gleichzeitiger Expression von p110 γ und Ras ebenfalls keine erhöhte Kinaseaktivität nachweisen konnte (Rubio, I, 1997 und 1997b).

Möglicherweise agiert p110 γ gar nicht als Ras-Effektor, sondern reguliert seinerseits die Membranassoziation von Ras oder seine Aktivität, indem es durch die Komplexbildung vor GAP schützt. Solch eine GAP-schützende Funktion wird auch RhoGDI für das modifizierte Rac1-GTP zugeschrieben (Hancock, JF, 1993). Wie bereits oben erwähnt, konnte in mit GST-p110 γ infizierten SF9-Zellen ein Anstieg des Ras-GTP/Ras-GDP Verhältnisses verzeichnet werden (Rubio, I, 1997). Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass ein weiterer Faktor für die Lipidkinaseaktivierung existiert. Bei einer Aufreinigung von p110 γ aus neutrophilen Zellen des Schweins, zeigte sich die Kinase in Assoziation mit einem 100 kDa Protein, p101 genannt (Stephens, L R, 1997). Und dieses Protein kann die p110 γ -Aktivität durch den G β γ -Komplex verstärken (Stoyanov, B, 1995) (Stephens, LR, 1997) (Bondev, A, 1999). Solch ein Faktor fehlt bei den *in vitro* - Versuchen.

Dennoch ist auch die Regelung der Membranassoziation denkbar.

Wie bereits bei den Experimenten mit Ras-Mutanten zur Bestimmung der Bindungsdomäne angesprochen scheint der hydrophobe Rest des Ras eine zweite Proteininteraktionsdomäne zu enthalten. Wäre dies tatsächlich der Fall, würde die Ras-Bindung an einen Effektor zur Besetzung und damit zur Maskierung dieser Domäne am Prenylrest führen. Eine Ablösung des Ras aus der Zellmembran wäre die Folge.

In den folgenden *in vitro*-Bindungsversuchen mit Membranbruchstücken von H-Ras-transfezierten SF9-Zellen und GST-p110 γ sollte eine derartige mRas-Rekrutierung aus der Zellmembran in das Cytosol durch die Lipidkinase untersucht werden. Bei jeweils gleichem Ras-Gehalt wurden steigende Konzentrationen an p110 γ hinzugefügt. Bei einer Mobilisierung des modifizierten Ras aus der Zellmembran heraus müssten im Cytosol = Überstand ansteigende Konzentrationen von gelöstem Ras sichtbar sein. Im Western Blot (Abb. 15) fanden sich jedoch in allen Ansätzen annähernd gleiche Mengen an gelöstem Ras. Auch die negativen Kontrollen, die keine Lipidkinase enthielten, zeigten den gleichen Gehalt an gelöstem Ras. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei lediglich um eine unspezifische Lösung des mRas aus der Zellmembran handelt. Eine Rekrutierung des mRas durch p110 γ aus seiner Membranverankerung heraus konnte in den *in vitro* Versuchen jedenfalls nicht nachgewiesen werden.

Gleichzeitig fielen in den Western Blots geringe Mengen von p110 γ in dem Pellet = Membranbruchstücken auf. Folglich wurde die Frage aufgeworfen, ob die PI3K γ durch das modifizierte, membranverankerte Ras zur Zellmembran und damit zu seinen Substraten gebracht wird. Solch eine Membranrekrutierung würde durchaus Sinn machen, ist doch die Lipidkinase wasserlöslich, ihre Substrate dagegen fettlöslich. Zur Phosphorylierung der Substrate muss also ein Enzymtransfer aus der wasserlöslichen Phase zur Zellmembran stattfinden (Kirsch, C, 2001).

Bekannt ist so eine Membranrekrutierung von Raf. Der Nukleotidaustausch katalysiert durch Sos aktiviert Ras. Ras-GTP rekrutiert Raf durch die Bindung an die NH₂-terminale CR1-Domäne an die Plasmamembran. Die Interaktion zwischen den Proteinen ist vorübergehend und Raf verbleibt dann unabhängig von Ras an der Membran. Auch die Raf-Aktivierung ist Ras-unabhängig, so dass die Rolle des Ras in der reinen Membranrekrutierung zu liegen scheint, und die Membrananlagerung führt schließlich zur Raf-Aktivierung. Membranassoziiertes Raf wiederum ist in der

Lage den MAPK-Signalweg zu aktivieren (Leevers, SJ, 1994) (Stokoe, D, 1994) (Hall, A, 1994). Somit ist auch erklärt, dass posttranslational modifiziertes Ras zur Aktivierung des MAPKinase-Signalweges benötigt wird (Leevers, SJ, 1992) (Itoh, T, 1995).

Solch eine ähnliche Rolle des Ras für die p110 γ konnte nicht nachgewiesen werden (siehe Kap.5.6).

Dennoch spielt die subzelluläre Lokalisation des Ras eine kritische Rolle in der Aktivierung nachfolgender Effektoren. Eine Hemmung der posttranslationalen Modifikation verhindert die Plasmamembranbindung und führt zu einem Verlust der biologischen Aktivität des Ras (Hancock, JF, 1989). So wird zum Beispiel auch die oben genannte Raf-Aktivierung verhindert, wenn auch nicht die Assoziation des Ras mit Raf (Lerner, EC, 1995). Auch das transformierende Potential der onkogenen Ras-Varianten wird durch die Störung der posttranslationalen Modifizierung beeinträchtigt (Jackson, JH, 1990). Unter anderem wurde eine Punktmutante des onkogenen Ha-Ras entdeckt, die nicht farnesyliert werden konnte. Als Folge dessen war sie nicht befähigt, p110 α in Cos7-Zellen zu aktivieren (Rodriguez-Viciano, P, 1996).

Die subzelluläre Lokalisation wiederum hängt ab von dem Ras-Modifizierungsgrad. Der Prozess der posttranslationalen Modifizierung von Ras-Proteinen der Säugetiere beginnt zunächst im Cytosol durch die Farnesyltransferase und wird dann auf der cytosolischen Seite des endoplasmatischen Reticulums (ER) durch die Enzyme Rce1 (Ras and a-factor converting enzyme) und Icmt (isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase) fortgesetzt (Kim, E, 1999) (Otto, JC, 1999) (Hrycyna, CA, 1991) (Dai, Q, 1998). Dabei wird das K-Ras stärker methyliert als das H-Ras oder N-Ras, allerdings ist unklar, weshalb dies der Fall ist (Choy, E, 1999). Anschließend nehmen die Ras-Proteine einen von zwei möglichen Wegen Richtung Plasmamembran, das Erkennungssignal hierfür scheint aminoterminal der farnesylierten Cysteine zu liegen (Hancock, JF, 1990) (Hancock, JF, 1991).

K-Ras verlässt das ER und gelangt über einen bis jetzt kaum beschriebenen Weg, wohl aber durch den Golgi-Apparat an die Plasmamembran. H-Ras und N-Ras werden am ER palmitoyliert und gelangen durch den klassischen Sekretionsweg über den Golgi-Apparat (Exozytose) an die Plasmamembran (Hancock, JF, 1990) (Choy, E, 1999) (Apolloni, A, 2000) (Hancock, JF, 2003). Die korrekte Modifizierung des CAAX-Motivs spielt für den weiteren Transport an die Zellmembran eine

wichtige Rolle, denn die Deletion von Rce1 oder Icmt führt zu einer Lokalisierung des Ras im Cytosol (Bergo, MO, 2000) (Bergo, MO, 2001) (Bergo, MO, 2002). Ras-Mutanten, die nicht modifiziert werden können, oder Ras-Proteine, deren Modifizierung durch Compactin gehemmt wurde, können also nicht an die Zellmembranen binden und sie zeigen auch kein transformierendes Potential. Man folgert daraus, dass die Bindung an Membranen eine wichtige Rolle hat in der Vermittlung der biologischen Funktion des Ras (Jackson, JH, 1990) (Hancock, JF, 1990).

Welche Rolle spielt nun der Grad der Ras-Modifizierung bei der Komplexbildung mit p110 γ ?

In den vorherigen Versuchen wurde bereits festgehalten, dass modifiziertes Ras unabhängig von der Nukleotidbindung (GTP oder GDP) binden kann (siehe 5.3). Unklar war, welcher Schritt der Modifikation eine entscheidende Rolle für die Komplexbindung zwischen Ras-GTP und p110 γ ist. Dazu wurden SF9-Zellen sowohl mit wtRas, als auch mit p110 γ infiziert. Es wurde der Effekt verschiedener Inhibitoren der Ras-Modifizierung getestet (bekanntermaßen überwiegt in vivo die Komplexbildung mit Ras-GTP gegenüber mit Ras-GDP deutlich) (Rubio, I, 1997).

Einer der Inhibitoren ist das Mevastatin, auch als Compactin bekannt. Dabei handelt es sich um einen spezifischen Hemmstoff der Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase, ein Enzym der Cholesterol Biosynthese (Rubio, I, 1997). Die Synthese von Polyisopren-Vorläufern, die für die Proteinprenylierung benötigt werden, wird dadurch gehemmt. Ein Effekt des Mevastatins auf das GDP/GTP-Bindungsverhältnis wurde bereits für V12Ha-Ras-Proteine ausgeschlossen (Rubio, I, 1999). Ein weiterer Stoff ist das FPT III. Es inhibiert die Anheftung des Prenylrestes u. damit die Farnesylierung des Ras. Das FTS verhindert die Methylierung der Carboxylgruppe des Ras.

Wie in Abb. 19 sichtbar, muss eine Reduktion von wtHa-Ras unter FTS berücksichtigt werden. Am ehesten handelt es sich dabei um einen zytotoxischen Effekt. Eindeutig sichtbar wurde jedoch, dass der Schritt der Farnesylierung eine Schlüsselrolle in der Komplexbildung mit dieser Lipidkinase einnimmt (Abb.17). Denn sowohl unter Einfluss von Mevastatin, als auch von FPT III, wurde eine Bindung von p110 γ an wtHa-Ras, insbesondere an die schneller wandernde Ras-Bande, die einen modifizierten Ras-Typ repräsentiert, nahezu vollständig verhindert. Und trotz eines vierfachen Überschusses von unmodifiziertem

gegenüber modifiziertem Ras in SF9-Zellen, wird mit Hilfe von GST-p110 γ überwiegend mRas präzipitiert, darin begründet, dass es sich hierbei um den stabileren Komplex handelt (Rubio, I, 1999).

Zu dem gleichen Ergebnis führten Experimente zur Dissoziationskinetik von GTP-Ha-Ras/p110 γ Komplexen in unserem Labor. Denn auch die Tatsache, dass sich *in vitro* farnesyliertes Ha-Ras in den Dissoziationsexperimenten wie voll modifiziertes Ha-Ras, aus SF9 Zellen aufgereinigt, verhält, demonstriert, dass die Farnesylierung des Ras die kritische Modifikation für die mRas-p110 γ Interaktion ist und andere, nachfolgende Modifikationsschritte keine Rolle spielen (Rubio, I, 1999).

Auch andere Laborgruppen kamen zu denselben Ergebnissen. Zellmutanten von *Saccharomyces cerevisiae*, denen eine Methyltransferaseaktivität fehlt, weisen keine messbare Beeinträchtigung der Ras-Funktion oder der Lebensfähigkeit auf. Lediglich eine kinetische Verzögerung in der Ras2-Reifung und eine gering verminderte Menge von membrangebundenem Ras2 fielen auf (Hrcycyna, CA, 1991). Dagegen erleiden Mutanten mit fehlender Farnesylierungsfähigkeit schwere Wachstumsdefekte (Powers, S, 1986). In NIH 3T3 Zellen werden das CAAX-Motiv und die polybasische Domäne zwar für die Plasmamembranbindung von p21-K-ras(B) benötigt, nicht jedoch für die transformierende Aktivität einer onkogenen Mutante p21ras (Hancock, JF, 1990) (Siddiqui, AA, 1998). In *in vitro* Versuchen aktiviert nur modifiziertes Ras-GTP die MAPK Signalkaskade, wobei die Prenylgruppe am C-terminalen Ras-Ende ausreichend für die Aktivierung ist (McGeady, P, 1995).

In derselben Untersuchung wurde auch der Einfluss von EDTA- und EGTA-haltigen Lyse-Puffern, also dem Entzug von Calcium- und Magnesiumionen, bzw. dem Entzug von Calciumionen, untersucht. Es zeigte sich unter der EDTA-Lyse eine vermehrte Bindung von modifiziertem Ras an p110 γ (Abb.17). Zweitens fiel ein Fehlen der obersten Ras-Bande auf, sowohl unter EDTA-, als auch unter EGTA-Lyse auf. Es folgten daraufhin weitere Versuche mit EDTA um dies zu verifizieren. Verwendet wurde unter anderem V12/S186, eine Ras-Mutante, der die Aminosäure 186 (Cystin) fehlt und daher nicht farnesyliert werden kann. Und V12/S181/184, bei dem die Aminosäuren 181 und 184 ausgetauscht worden sind, wodurch das Protein nicht methyliert werden kann. Deutlich ist in Abb.18 zu erkennen, dass bei fehlender Farnesylierung die am schnellsten wandernde Ras-Bande fehlt, ein weiterer

Beweis, dass es sich bei dieser Bande um eine modifizierte Ras-Form handeln muss.

Entscheidend ist jedoch, dass das, was sich in den vorherigen Experimenten angedeutet hat, bestätigt werden konnte: bei den Zellysaten trat unter EDTA-Einfluss sowohl bei wtRas, als auch bei den anderen Ras-Mutanten, keine dritte Ras-Bande auf, die in der Elektrophorese am langsamsten wanderte und ca. 20 kDalton Masse hat. Dafür gibt es zwei mögliche Erklärungen. Es könnte sich um eine Zwischenstufe an Modifizierung handeln. ,.

Eine weitere Erklärung beruht ebenso auf der Tatsache, dass die Calcium- und Magnesiumionen als Enzym-Cofaktoren dienen. Ebenso könnte durch den Ionenentzug unter EDTA ein Enzym inaktiviert werden, dass normalerweise den Abbau von Ras, bzw. das abbauende Enzym hemmt. Passend zu dieser möglichen Erklärung existiert ein Abbauprodukt von Ras mit um 1000 Dalton kleinerer Masse (Page, MJ, 1998). Und auch die Mg-Ionen, die zur Neutralisation von den negativen Gruppen des GTP benötigt werden, spielen bei der Inaktivierung durch eine GTPase eine Rolle (Schlichting, I, 1990) (Milburn, MV, 1990).

Des Weiteren fällt eine verstärkte mRas-Bindung an p110 γ unter dem Einfluss von EDTA auf (Abb.18). Eine mögliche Begründung wäre die Beeinflussung der Nukleotidbindung. Normalerweise werden für Nukleotidbindungen an das Ras-Protein Magnesium-Ionen benötigt, damit sich die negativen Gruppen des Ras und die negativen Gruppen von GDP/GTP nicht abstoßen. Unter EDTA-Lyse dürfte Ras also weder an GDP, noch an GTP gebunden sein, trotzdem wird vor allem modifiziertes Ras gebunden. Möglicherweise ist mRas also nicht nur unabhängig von einer GTP-Bindung (im Gegensatz zu unmodifiziertem Ras, das in GDP-gebundener Form inaktiv ist), sondern auch unabhängig von einer Nukleotidbindung generell.

Abschließend lässt sich festhalten, dass sich p110 γ wie ein Ras-Effektor verhält, da es in GTP-abhängiger Weise an Ha-Ras bindet. Die Bindungsstelle muss dabei sowohl für modifiziertes, als auch für unmodifiziertes Ras zwischen den AS 98 – 740 liegen. Tatsächlich wird mehr als die Hälfte der p110 γ -Sequenz für die beobachtete Bindung an Ras benötigt, ein Hinweis, dass die RBD von p110 γ Teil einer größeren Struktureinheit ist. Im Gegensatz zur p110 α , das unabhängig von der Modifikation nur Ras-GTP bindet (Rodriguez-Viciano, P, 1994) (Rodriguez-Viciano, P, 1996) (Rubio, I, 1997) (Downward, J, 1999), bindet in *in vitro*

Experimenten nur unmodifiziertes Ras in GTP-Abhängigkeit an p110 γ . Modifiziertes Ras bindet sowohl in GTP-gebundener Form, als auch in GDP-gebundener Art und Weise an die neue Isoform. Zu gleichen Ergebnissen führten *in vivo* Experimente mit SF9-Zellen (Rubio, I, 1999). Interessanterweise ergaben sich unter Entzug von Magnesium-Ionen auch Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen mRas und p110 γ , die ohne Nukleotidbindung generell ablaufen kann.

Vermutlich existiert eine zweite Bindungsstelle für p110 γ , die lediglich das modifizierte Ras besitzt. Somit wäre die erhöhte Bindungskapazität von mRas gegenüber uRas erklärt (Rubio, I, 1999), und ebenso wäre erklärt, warum der Komplex Ras-GTP-p110 γ weniger empfindlich auf GAP's reagiert als der Komplex mit der unmodifizierten Variante. Und in der Tat wurde inzwischen in Strukturuntersuchungen durch Pacold *et al.* gezeigt, dass der C-Terminus von Ras parallel zur und in unmittelbarer Nähe der Oberfläche von p110 γ in Richtung Membran verlaufen muss und damit eine Interaktion zwischen dem C-Terminus des modifizierten Ras und der Kinase denkbar ist (Pacold, ME, 2000).

Es konnte gezeigt werden, dass eine Schlüsselrolle in der Komplexbildung mit der Lipidkinase der Schritt der Farnesylierung einnimmt. Die Ergebnisse demonstrieren, dass p110 γ einen kinetisch stabileren Komplex mit farnesyliertem Ras eingeht. Anders als bei p110 α/β konnte keine erhöhte Kinaseaktivität der PI3K γ durch die Komplexbildung *in vitro* nachgewiesen werden. Möglicherweise werden dazu zusätzliche Regulatorproteine benötigt. Eine Membranrekrutierung der Kinase durch Ras, wie es bereits für Raf-1 bekannt ist, konnte jedenfalls ausgeschlossen werden. Umgekehrt wurde auch keine Membranlösung von mRas in das Cytosol nach Komplexbildung beobachtet. Nach den vorliegenden Ergebnissen besteht also die Aufgabe von p110 γ in der Regulation des Aktivitätsstatus des Ras, indem es stabile Komplexe bildet um vor GTPase aktivierenden Proteinen zu schützen. Solch eine GAP-schützende Funktion wird auch RhoGDI für das modifizierte Rac1-GTP zugeschrieben (Hancock, JF, 1993). Ermöglicht wird dies durch die Bereitstellung einer zweiten Bindungsstelle bei der Farnesylierung. Die Ergebnisse beweisen deutliche Unterschiede in den Interaktionen der verschiedenen PI3K mit modifiziertem und unmodifiziertem Ras. Interessant wäre, ob die beobachtete stabilisierende Wechselwirkung von p110 γ auf Ras auch unter physiologischen Bedingungen zu beobachten ist. Auch sollte die Möglichkeit einer absoluten

Nukleotidunabhängigkeit des mRas für die Interaktion mit p110 γ weiter untersucht werden.

7 Schlussfolgerungen

Es wurde bewiesen, dass sich p110 γ wie ein Ras-Effektor verhält, da es in GTP-abhängiger Weise an Ha-Ras bindet. Die Bindungsstelle muss dabei sowohl für modifiziertes, als auch für unmodifiziertes Ras zwischen den AS 98 – 740 liegen. Mehr als die Hälfte der p110 γ -Sequenz wird für die Bindung an Ras benötigt. Dies ist ein Hinweis, dass die RBD von p110 γ Teil einer größeren Struktureinheit ist. In den *in vitro* Experimenten bindet nur unmodifiziertes Ras in GTP-Abhängigkeit an p110 γ . Modifiziertes Ras bindet sowohl in GTP-gebundener Form, als auch in GDP-gebundener Art und Weise an die neue Isoform. Dies stellt einen erheblichen Unterschied zur p110 α dar, die unabhängig von der Modifikation nur Ras-GTP bindet (Rodriguez-Viciana, P, 1994) (Rodriguez-Viciana, P, 1996) (Rubio, I, 1997) (Downward, J, 1999). Zu gleichen Ergebnissen führten im Übrigen auch *in vivo* Experimente mit SF9-Zellen durch Rubio et al. (Rubio, I, 1999). Interessanterweise ergaben sich unter Entzug von Magnesium-Ionen auch Hinweise auf eine Komplexbildung zwischen mRas und p110 γ , die ohne Nukleotidbindung generell ablaufen kann.

Eine mögliche Theorie ist die Existenz einer zweiten Bindungsstelle für p110 γ , die lediglich das modifizierte Ras besitzt. Damit ließe sich auch die verminderte Empfindlichkeit des Komplexes Ras-GTP-p110 γ gegenüber GAP's im Vergleich mit der unmodifizierten Variante erklären. Und ebenso die erhöhte Bindungskapazität vom mRas gegenüber uRas (Rubio, I, 1999). Und in der Tat wurde inzwischen in Strukturuntersuchungen durch Pacold *et al.* gezeigt, dass der C-Terminus von Ras parallel zur und in unmittelbarer Nähe der Oberfläche von p110 γ in Richtung Membran verlaufen muss und damit eine Interaktion zwischen dem C-Terminus des modifizierten Ras und der Kinase denkbar ist (Pacold, ME, 2000).

Es wurde dargestellt, dass eine Schlüsselrolle in der Komplexbildung mit der Lipidkinase der Schritt der Farnesylierung einnimmt. Die Ergebnisse demonstrieren, dass p110 γ einen kinetisch stabileren Komplex mit farnesyliertem Ras eingeht. Anders als bei p110 α/β konnte keine erhöhte Kinaseaktivität der PI3K γ durch die Komplexbildung *in vitro* nachgewiesen werden. Möglicherweise werden dazu zusätzliche Regulatorproteine benötigt. Eine Membranrekrutierung der Kinase durch Ras, wie es bereits für Raf-1 bekannt ist, konnte jedenfalls ausgeschlossen

werden. Umgekehrt wurde auch keine Membranlösung von mRas in das Cytosol nach Komplexbildung beobachtet. Nach den vorliegenden Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass die Aufgabe von p110 γ darin besteht den Aktivitätsstatus des Ras zu regulieren, indem es stabile Komplexe mit mRas-GTP eingeht und vor GTPase aktivierende Proteine schützt. Eine ähnlich GAP-schützende Funktion ist zum Beispiel auch von RhoGDI bezüglich des modifizierten Rac1-GTP bekannt (Hancock, JG, 1993). Ermöglicht wird dies ebenfalls durch die Bereitstellung einer zweiten Bindungsstelle in der Farnesylierung.

Somit konnten in dieser Arbeit deutliche Unterschiede in den Interaktionen der verschiedenen PI3K-Isoformen mit modifiziertem und unmodifiziertem Ras nachgewiesen werden.

8 Literaturverzeichnis

- Apolloni, A, Prior, IA, Lindsay, M, Parton, RG, and Hancock, JF. 2000.
H-ras but not K-ras traffics through the plasma membrane through the exocytic pathway. Mol Cell Biol 20: 2475 – 2487
- Baker, TL, Booden, M.A, and Buss, JE. 2000.
S-Nitrosocysteine increases palmitate turnover on Ha-Ras in NIH3T3 cells. J Biol Chem 27: 22037 – 22047
- Barbacid, M. 1987.
Ras Genes. Annu Rev Biochem 5: 779 – 827
- Bhattacharya, M, Babwah, AV, Ferguson, SSG. 2004.
Small GTP-binding protein-coupled receptors. Biochem Soc Tran. 32: 1040 – 1044
- Bellacosa, A, Testa, JR, Staal, SP, and Tsichlis, PN. 1991.
A retroviral oncogene, akt, encoding a serine-threonine kinase containing an SH2-like region. Science 254: 274 – 277
- Bergo, MO, et al. 2000.
Targeted inactivation of the Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase gene causes mislocalization of K-ras in mammalian cells. J Biol Chem 275: 17605 – 17610
- Bergo, MO, et al. 2001.
Isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase deficiency in mice. J Biol Chem 276: 5841 – 5845
- Bergo, MO, et al. 2002.
Absence of the CAAX endoprotease Rce1: effects on cell growth and transformation. Mol Cell Biol 22: 171- 181

Bogoyevitch, MA, Anderson, MB, Gillespie-Brown, J, Clerk, A, Gennon, PE, Fuller, SJ, and Sugden, PH. 1996.

Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem J* 314: 115 – 121

Boguski, MS, McCormick, F. 1993.

Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643 – 654

Bollag, G, McCormick, FA, 1991.

Regulators and effectors of ras proteins. *Rev Cell Biol* 7, 601 – 632

Bondev, A, Rubio, I, Wetzker, R. 1999.

Differential regulation of lipid and protein kinase activities of phosphoinositide 3-kinase gamma in vitro. *Biol Chem* 380, 11: 1337 – 1340

Bondeva, T, Pirola, L, Bulgarelli-Leva, G, Rubio, I, Wetzker, R, Wymann, M. 1998.

Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K γ to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282: 293 - 296

Bos, JL. 1989.

ras Oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Research* 49: 4682 – 4689

Brock, C, Schaefer, M, Reusch, HP, Czupalla, C, Michalke, M, Spicher, K, Schultz, G, Nurnberg, G, 2003.

Roles of G beta gamma in membrane recruitment and activation of p110 γ /p101 Phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Cell Biol* 160, 1: 89-99

Brtnva, TR, Diugen, JK, Ghosh, S, Terrell, RS, Campbell-Burk, S, Bell, RM, and Der, CJ. 1995.

Two distinct Raf domains mediate interaction with Ras. *J Biol Chem*, 270, 17: 9809 – 9812

Buday, L, and Downward, J. 1993.

Epidermal growth factor regulates p21ras through the formation of a complex of receptor, Grb2 adapter protein, and Sos nucleotide exchange factor. *Cell* 73: 611 – 620

Burgering, BMT, Medema, RH, Maassen, JA, van de Wetering, ML, van der Eb, AJ, McCormick, F, and Bos, JL. 1991.

Insulin stimulation of gene expression mediated by p21ras activation. *EMBO J* 10, 5: 1103 – 1109

Cadwallader, KA, Paterson, H, Macdonald, SG, and Hancock, JF. 1994.

N-Terminally myristoylated Ras proteins require palmitoylation or a polybasic domain for plasma membrane localization. *Mol Cell Biol* 14, 7: 4722 – 4730

Cano, E, and Mahadevan, LC. 1995.

Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20: 117 – 122

Cantor, SB, Urano, T, and Feig, LA. 1995.

Identification and Characterization of Ral-binding Protein 1, a potential downstream target of Ral GTPases. *Mol Cell Biol*, 15, 8: 4578 – 4584

Carey, KD, Dillon, TJ, Schmitt, JM, Baird, AM, Holdorf, AD, Straus, DB, Shaw, AS, Stork, PJ. 2000.

CD28 and the tyrosine kinase Lck stimulate mitogen-activated protein kinase activity in T cells via inhibition of the small G protein Rap1. *Mol Cell Biol* 20, 22: 8409 – 8419

Carpenter, CC, Auger, UR, Chaudhuri, M, Yoakim, M, Schaffhausen, B, Schoelson, S, and Cantley, LC. 1993.

Phosphoinositide 3-Kinase is activated by phosphopeptides that bind to the SH2 domains of the 85-kDa subunit. *J Biol Chem* 268, 13: 9478 – 9483

Caverzasio, J, Palmer, G, Suzuki, A, Bonjour, J. 2000.

Evidence for the involvement of two pathways in activation of extracellular signal-regulated kinase (Erk) and cell proliferation by Gi and Gq protein-coupled receptors in Osteoblast-like cells. J Bone Miner Res 15, 9: 1697 – 1709

Chang, EC, Barr, M, Wang, Y, Jung, V, Xu, HP, and Wigler, MH. 1994.

Cooperative interaction of S. pombe proteins required for mating and morphogenesis. Cell 79, 1: 131 – 141

Chen, X, and Resh, MD. 2001.

Activation of mitogen-activated protein kinase by membrane-targeted Raf chimeras is independent of raft localization. J Biol Chem 276: 34617 – 34623

Chiu, VK, et al. 2002.

Ras signaling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. Nature Cell Biol. 4: 343 - 350

Choy, E, et al. 1999.

Endomembrane trafficking of Ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. Cell 98: 69 - 80

Clark, GJ, and Der, CJ. 1993.

GTPases in Biology I. Springer Verlag: 259 – 288

Clark, GJ, Kinch, MS, Rogers-Graham, K, Sebt, SM, Hamilton, AD, and

Der, CJ. 1997.

The Ras-related protein Rheb is farnesylated and antagonizes Ras Signaling and transformation. J Biol Chem 272, 16: 10601 – 10615

Coffer, PJ, and Woodgett, JF. 1991.

Molecular cloning and characterisation of a novel putative protein-serine kinase related to the cAMP-dependent and protein kinase C families. Eur J Biochem 201: 475 – 481

Cowley, S, Paterson, H, Kemp, P, and Marshall, CJ. 1994.

Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 Cells. *Cell* 77: 841 – 852

Dai, Q, et al. 1998.

Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic Reticulum. *J Biol Chem* 273: 15030 – 15034

Daum, G, Eisenmann-Tappe, I., Fries, HW, Troppmair, J, Rapp, UR. 1994.

The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci*, 19: 474 – 480

Davis, RJ. 1993.

The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 268, 20: 14553 – 14556

Dent, P, Haser, W, Haystead, T, Vincent, LA, Raberts, TM, Sturgill, TW 1992.

Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-raf in NIH 3T3 cells and in vitro. *Science* 257, 5075: 1404 – 1407

Downward, Julian. 1990.

The ras superfamily of small GTP-binding proteins. *TIBS* 15: 469 – 472

Downward, J, Wetzker, R. 1999.

Farnesylation of Ras is important for the interaction with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Eur J Biochem* 266, 1: 70-82

Dudley, DT, Pang, L, Decker, SJ, Bridges, AJ, Saltiel, AR. 1995.

A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92: 7686 – 7684

Duronio, V, Welham, MJ, Abraham, S., Dryden, P, and Scrader, JW. 1992.
p21 ras activation via hemopoietin receptors and c-kit requires tyrosine kinase activity but not tyrosine phosphorylation of p21ras GTPase-activating protein. Proc Natl Acad Sci USA 89, 5: 1587 – 1591

Emerson, SD, Madison, VS, Palermo, RE, Waugh, DS, Scheffler, JE, Tsao, KL, Kiefer, SE, Liu, SP, Fry, DC. 1995.
Solution Structure of the Ras-binding domain of c-Raf-1 and identification of its Ras interaction surface. Biochemistry 34, 21: 6911 – 6918

Fabian, JR, Vojtek, AB, Cooper, JA, and Morrison, DU. 1994.
A single amino acid change in Raf-1 inhibits Ras binding and alters Raf-1 function. Proc Natl Acad Sci USA 91: 5982 – 5980

Feig, LA. 1994.
Guanin-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. Curr Opin Cell Biol 6, 2: 204-211

Foster, LJ, De Hoog, CL, Mann, M. 2003.
Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. Proc Natl Acad Sci USA 100, 10: 5813 – 5818

Franke, TF, Kaplan, DR, and Cantley, LC. 1997.
PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. Cell 88: 435 – 437

Frisch, SM, Francis, H. 1994.
Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. J Cell Biol 124, 4: 619 – 626

Furth, ME, Davis, LJ, Fleurdelys, B, Scolnick, EM. 1982.
Monoclonal antibodies to the p21 products of the transforming gene of Harvey murine sarcoma virus and of the cellular ras gene family. J Virol 43, 1: 294 – 304

Gibbs, JB, Marshall, MS, Scolnick, EM, Dixon, RF, and Vogel, US. 1990.
Modulation of guanine nucleotides bound to Ras in NIH3T3 cells by oncogenes, growth factors, and the GTPase activating protein CGAP. J Biol Chem 265, 33: 20437 – 20442

Gillespie-Brown, J, Fuller, SJ, Bogoyevitch, MA, Cowley, S, and Sugden, P. 1995.
The Mitogen-activated Protein Kinase Kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the Hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. J Biol Chem 270, 47: 28092 – 28096

Glomset, JA, Gelb, MH, Farnsworth, CC. 1990.
Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. Trends Biochem Sci 15: 139 – 142

Gutierrez, L, Magee, AI, Marshall, CJ, and Hancock, JF. 1989
Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. EMBO 8, 4: 1093 – 1098

Hall, A. 1994.
A biochemical function for Ras – at last. Science 264: 1413 – 1414

Hancock, JF, Magee, AI, Childs, JI, and Marshall, CJ. 1989.
All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. Cell 57: 1167 – 1177

Hancock, JF, Paterson, H and Marshall, CJ. 1990.
A polybasic domain or palmytoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. Cell 63: 133 – 139

Hancock, JF, Cadwallader, K, Paterson, H, and Marshall, CJ. 1991.
A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of Ras proteine. EMBO J 10: 4033 - 4039

Hancock, JF, Hall, A. 1993.

A novel role for RhoGDI as an inhibitor of GAP proteins. EMBO J 12, 5: 1915-1921

Hancock, JF. 2003.

Ras Proteins: Different signals from different locations. Nat Rev Mol Cell Biol 4: 373-384

Hartley, KO, Gell, D, Smith, GC, Zhang, H, Divecha, N, Connelly, MA, et al. 1995.

DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of Phosphatidylinositol 3-Kinase and the Ataxia telangiectasia gene product. Cell 82: 849 – 856

Hawes, Brian E, Louis M Luttrell, Tim van Biesen, and RJ Lefkowitz. 1996.

Phosphatidylinositol 3-Kinase is an early intermediate in the G β γ -mediated mitogen-activated protein kinase signaling pathway. J Biol Chem, 271, 21: 12133 – 12136

Hawkins, PT, Eguinoa, A, Qiu, RG, Stokoe, D, Cooke, FT, Walters, R, Wennström, S, Claesson-Welsh, L, Evans, T, Symons, T, et al. 1995.

PDGF stimulates an increase in GTP-Rac via activation of phosphoinositide 3-kinase. Curr Biol 5, 4: 393 – 403

Herold, G und Mitarbeiter. 1997.

Innere Medizin – Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Herausgeber Dr. med. G Herold: 398 - 399

Hehl, S, Stoyanov, B, Oehrl, W, Schönherr, R, Wetzker, R, Heinemann, S. 2001.

Phosphoinositide 3-kinase- γ induces Xenopus oocyte maturation via lipid kinase activity. Biochem J 360: 691 - 698

Herrmann, C, Martin, GA, and Wittinghofer, A. 1995.

Quantitative analysis of the Complex between p21ras and the ras-binding domain of the human raf-1 protein kinase. J Biol Chem, 270, 7: 2901 – 2905

Hiles, ID, et al. 1992.

Phosphatidylinositol 3-kinase: structure and expression of the 110 kd catalytic subunit. *Cell* 70, 3: 419 – 429

Howe, CL, Valletta, JS, Rusnak, AS, and Mobley, W. 2001.

NGF signaling from clathrin-coated vesicles: evidence that signaling endosomes serve as a platform for the Ras-MAPK pathway. *Neuron* 32: 801 - 814

Howe, LR, Leever, SJ, Gomez, N, Nakielnny, S, Cohen, P, Marshall, CJ. 1992.

Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase raf. *Cell* 71, 2: 335 – 342

Hrcycyna, CA, Sapperstein, SK, Clarke, S, and Michaels, S. 1991.

The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and Ras proteins. *EMBO* 10, 7: 1699 - 1709

Hu, P, Mondino, A, Skolnik, EY, and Schlessinger, J. 1993.

Cloning of a novel, ubiquitously expressed human Phosphatidylinositol 3-Kinase and identification of its binding site on p85. *Mol Cell Biol* 13, 12: 7677 – 7688

Hu, Q, Klippel, A, Muslin, AJ, Fantl, WJ, Williams, LT. 1995.

Ras-dependent induction of cellular responses by constitutively active phosphatidylinositol 3-kinase. *Science* 268: 100 – 102

Inukai, K, Anai, M., Van Breda, E, Hosaka, T, Katagiri, H, et al. 1996.

A novel 55-kDa regulatory subunit for Phosphatidylinositol 3-kinase structurally similar to p55PIK is generated by alternative splicing of the p85 α gene. *J Biol Chem* 271, 10: 5317 – 5320

Itoh, T, Kaibuchi, K, Matsuda, T, Yamamoto, T, Matsura, Y, Maeda, A, Shimizu, K, Takai, Y. 1993.

The post-translational processing of ras p21 is critical for its stimulation of mitogen-activated protein-kinase. *J Biol Chem* 268, 5: 3025 – 3028

Jackson, JH, Cochrane, CG, Bourne, JR, Soliski, PA, Buss, JE and Der, CJ. 1990.
Farnesol modification of Kirsten-ras exon 4B protein is essential for transformation.
Proc Natl Acad Sci USA 87: 3042 – 3046

Jaumot, M, and Hancock, JF. 2001.
Protein phosphatases 1 and 2A promote Raf-1 activation by regulating 14-3-3
interactions. Oncogene 20: 3949 – 3958

Jaumot, M, et al. 2002.
The linker Domain of the H-Ras hypervariable region regulates interactions with
exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinases. J Biol Chem 277: 272 -
278

Jiang, X, and Sorkin, A. 2002.
Coordinated traffic of Grb2 and Ras during epidermal growth factor receptor
endocytosis visualized in living cells. Mol Biol Cell 13: 1522 - 1535

Jones, PF, Jakubowicz, T, Pitossi, FJ, Maurer, F, and Hemmings, BA. 1991.
Molecular cloning and identification of a serine / threonine protein kinase of the
second-messenger subfamily. Proc Natl Acad Sci USA 88: 4171 – 4175

Karin, M. 1995.
The regulation of AP-1 activity by Mitogen-activated Protein Kinases. J Biol Chem
270, 28: 16483 – 16486

Khwaja, A, Rodriguez-Viciana, P, Wennström, S, Warne, PH, and Downward, J.
1997.
Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH
kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. EMBO 16, 10: 2783 –
2793

Kikuchi, A, Williams, LT. 1994.
The post-translational modification of ras p21 is important for Raf-1 activation. J Biol
Chem 269, 31: 20054-20059

Kikuchi, A, Demo, SD, Ye, ZH, Chen, YW, Williams, LT. 1994.

rasGDS family members interact with the effector loop of ras p21. Mol Cell Biol, 14, 11: 7483 – 7491

Kim, E, et al. 1999.

Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of ras within cells. J Biol Chem 274: 8383 - 8390

Koch, WJ, Hawes, BE, Allen, LF., and Lefkowitz, RJ. 1994.

Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 26: 12706-12710

Kodaki, T, Wosholski, R, Hallberg, B, Rodriguez-Viciana, P, Downward, J, and Parker, PJ. 1994.

The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. Curr Biol 4, 9: 798 – 806

Kolch, W, Heidecker, G, Kochs, G, et al. 1993.

Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. Nature 364, 6434: 249-252

Kolch, W. 2000.

Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. Biochem J 351: 289 - 305

Khosravi – Far, R, Solski, PA, Clark, GJ, Kinch, MS, and Der, CJ. 1995.

Activation of Rac1, RhoA, and Mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. Mol Cell Biol 15, 11: 6443 – 6453

King, LA, et al, 1992.

The Baculovirus Expression system: a laboratory guide. Chapman and Hall, London.

Kirsch, C, Wetzker, R, Klinger, R. 2001.

Anionic phospholipids are involved in membrane targeting of PI3-Kinase gamma.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 282, 3: 691 - 6

Kitayama, H, Sugimoto, Y, Matsuzaki, T, Ikawa, Y, and Noda, M. 1989.

A ras -related gene with transformation suppressor activity. Cell 56: 77 – 84

Kitayama, H, Matsuzaki, T, Ikawa, Y, and Noda, M. 1990.

Genetic analysis of the Kirsten-ras revertant 1 gene: potentiation of its tumor suppressor activity by specific point mutations. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 11: 4284 – 4288

Klarlund, J.K, Guilherme, A, Holik JJ, et al. 1997.

Signaling by Phosphoinositide-3,4,5-triphosphate through proteins containing pleckstrin and Sec7 homology domains. Science 275, 3308: 1927 – 1930

Kubicek, M, et al. 2002.

Dephosphorylation of Ser-259 regulates Raf-1 membrane association. J Biol Chem 277: 7913 - 7919

Kunz, J, Henriquez, R, Schneider, U, Deuter-Reinhard, M, Movva, NR, et al.

Target of Rapamycin in Yeast, TOR2, is an essential Phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. Cell 73: 585 – 596

Kyriakis, JM, App, H, Zhang, XF, Banerjee, P, Brautigan, D, Rapp, U, Avruch, J. 1992.

Raf-1 activates MAP kinase-kinase. Nature 358, 6385: 417-21

Lange-Carter, CA, and Johnson, GL. 1994.

Ras-dependent growth factor regulation of MEK Kinase in PC12 cells. Science 265: 1458 – 1461

Leevers, SJ, Marshall CJ. 1992.

Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein.

EMBO J. 11,2: 569 – 574

Leevers, SJ, Paterson, HF, Marshall, CJ. 1994.

Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. Nature 369: 411 – 414

Lerner, EC, Qian, Y, Blaskovich, MA, Fossum, RD, Vogt, A, Sun, J, Der Cox, ADCJ, Hamilton, AD, and Sefti, SM. 1995.

Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signalling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. J Biol Chem 270, 45: 26802 – 26806

Lewin, B, „Gene“, 1. Auflage, Kap. 35.3, Wiley-VCH

Lewin, B, „Gene“, 1. Auflage, Kap. 35.4, Wiley-VCH

Li, G, D'Souza-Schorey, C, Barbieri, MA, Cooper, JA, and Stahl, PD. 1997.

Uncoupling of membrane ruffling and pinocytosis during Ras signal transduction. J Biol Chem 272: 10337 – 10340

Lin, TA, Kong, X, Haystead, TA, Pause, A, Belsham, G, Sonnenberg, N, and Lawrence, JJC. 1994.

PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. Science 266: 653 – 656

Loewinger, L., McKeon, F. 1988.

Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. EMBO J 7,8: 2301-2309

Lopez-Illasaca, M, Crespo, P, Pellicci, PG, Gutkind, JS, und Wetzker, R. 1997.

Linkage of G protein-coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-kinase γ . Science 275: 394 – 397

Lopez-Illasaca, M, Gutkind, JS, and Wetzker, R. 1998.

Phosphoinositide 3-kinase gamma is a mediator of Gbetagamma-dependent Jun kinase activation. J Biol Chem 273, 2505 – 2508

Luttrell, LM. 2002.

Activation and targeting of mitogen-activated protein kinases by G-protein coupled receptors. Can J Physiol Pharmacol 80,5: 375 - 382

MacDougall, LK, Domin, J, and Waterfield, MD. 1995.

A family of phosphoinositide 3-kinases in Drosophila identifies a new mediator of signal transduction. Curr Biol 5, 12: 1404 – 1415

Marinissen, MJ, Gutkind, JS. 2001.

G-protein coupled receptors and signalling networks: emerging paradigms. Trends Pharmacol Sci 22, 7:368 - 376

Marshall, CJ. 1994.

MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. Curr Opin Genet Dev, 4: 82 – 89

Marshall, CJ. 1996.

Ras effectors. Curr Opin Cell Biol 8: 197 – 204

Martin, GA, Viskochil, D, Ballag, G, McCabe, PC, Crosier, W, Haubruck, H, Conroy, L, Clark, R, O'Connell, P, Cawthorn, RM, Innis, MA, McCormick, F. 1990.

The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 Gene product interacts with ras p21. Cell 63: 843 – 849

Mason, CS, et al. 1999.

Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf, but not B-Raf activation. EMBO J 18: 2137 – 2148

Matallanas, D, et al. 2003

Differences on the inhibitory specificities of H-Ras, K-Ras, and N-Ras (N17) dominant negative mutants are related to their membrane microlocalization. J Bio Chem 278: 4572 - 4581

McGeady, P, Kuroda, S, Shimizu, K, Takai, Y, and Gelb, MH. 1995.

The farnesyl group of H-Ras facilitates the activation of a soluble upstream activator of mitogen-activated protein kinase. J Biol Chem 270, 44: 26347 – 26351

Milburn, MV, Tong, L, deVos, AM, Brunger, A, Yamaizumi, Z, Nishimura, Sand Kim, SH. 1990.

Molecular Switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. Science 247: 939 – 945

Molz, L, Chen, YW, Hirano, M, Williams, LT. 1996.

Cpk is a novel class of Drosophila PtdIns 3-Kinase containing a C2-domain. J Biol Chem 271, 23: 13892 – 13899

Morris, AJ, Rudge, SA, Mahlum, CE, and Jenco, JM. 1995.

Regulation of Phosphoinositide-3-kinase by G-protein $\beta\gamma$ subunits in a rat osteosarcoma cell line. Mol Pharm 48: 532 – 539

MPI für molekulare Physiologie, Postfach 500247, 44202 Dortmund.

www.mpi-dortmund.mpg.de.

Murga, C, Laguinge, L, Wetzker, R, Cuadrado, A and Gutkind, JS. 1998.

Activation of Akt/protein kinase B by G protein coupled receptors. A role for alpha and beta gamma subunits of heterotrimeric G-proteins acting through Phosphatidylinositol-3-OH kinase gamma. J Biol Chem 273, 30: 19080 - 19085

Muroya, K, Hattori, S, and Nakamura, S. 1992.

Nerve growth factor induces rapid accumulation of the GTP-bound form of p21 ras in rat pheochromocytoma PC12 cells. Oncogene 7, 2: 277 – 281

Nassar, N, Horn, G, Herrmann, C, Scherer, A, McCormick, F, Wittinghofer, A. 1995.
The 2,2 Å crystal structure of the Ras-binding domain of the serine/threonine kinase c-Raf1 in complex with Rap1A and a GTP analogue. *Nature* 375: 554 – 560

Ng, SSW, Tsao, MS, Chow, S, Hedley, DW. 2000.
Gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 60, 19: 5451 – 5455

Nishizuka, Y. 1992.
Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607 – 614

Niv, H, et al. 2002.
Activated K-Ras and H-Ras display different interactions with saturable nonraft sites at the surface of live cells. *J Cell Biol* 157: 865 - 872

Nobes, CD, Hall, A. 1995.
Rho, rac and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 1: 53-62

Otto, JC, Kim, E, Young, SG, and Casey, PJ. 1999.
Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *J Biol Chem* 274: 8379 – 8382

Pacold, ME, Suire, S, Perisic, O, Lara-Gonzalez, S, Davis, CT, Walker, EH, Hawkins, PT, Stephens, L, Eccleston, JF, and Williams, R. 2000.
Crystal structure and functional analysis of Ras binding to its effector Phosphoinositide 3-Kinase γ . *Cell* 103: 931 - 943

Page, MJ, Hall, A, Rhodes, S, Skinner, RH, Murphy, U, Sydenham, M, and Lowe, PN. 1989.
Expression and characterization of the Ha-ras p21 protein produced at high levels in the insect/baculovirus system. *J Biol Chem* 264: 19147 – 19154

Parker, PJ. 1995.

Intracellular signalling. PI 3-kinase puts GTP on the Rac. *Curr Biol* 5, 6: 577 – 579

Parton, RJ, and Hancock, JF. 2004.

Lipid rafts and plasma membrane microorganization: insights from Ras. *Trends in Cell Biology* 14: 141 - 147

Pons, S, Asano, T, Glasheen, E, Miralpeix, M, Zhang, Y, Fisher, TL, Myers, MG, Sun, XJ, and White, MF. 1995.

The structure and function of p55^{PIK} reveal a new regulatory subunit for Phosphatidylinositol 3-Kinase. *Mol Cell Biol* 15, 8: 4453 – 4465

Powers, S, Michaelis, S, Broek, D, Santa-Anna, AS, Field, J, Herskowitz, I, and Wigler, M. 1986.

RAM, a gene of yeast required for a functional modification of Ras proteins and for production of mating pheromone α -factor. *Cell* 47, 3: 413-422

Prior, IA, et al. 2001A.

GTP-dependent segregation of H-Ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nature Cell Biol.* 3: 368 – 375

Prior, IA, and Hancock, JF. 2001B.

Compartmentalization of Ras proteins. *J Cell Sci* 114: 1603 – 1608

Prior, IA, et al. 2003.

Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface Microdomains. *J Cell Biol* 16: 165 - 170

Qiu, MS, Green, SH. 1991.

NGF and EGF rapidly activate p21^{ras} in PC12 cells by distinct, convergent pathways involving tyrosine phosphorylation. *Neuron* 7,6: 937 – 946

Qiu, RG, Chen, J, Kim, D, McCormick, F, Symons, M. 1995.

An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature* 374: 457 – 459

Rameh, LE, Chen, CS, Cantley, LC. 1995.

Phosphatidylinositol (3,4,5)P₃ interacts with SH2 domains and modulates PI 3-Kinase association with tyrosine-phosphorylated proteins. *Cell* 83: 821 – 830

Ramirez, MT, Sah, VP, Zhao, X, Hunter, JJ, Chien, KR, and Brown, JH. 1997.

The MEKK-JNK pathway is stimulated by α_1 -adrenergic receptor and Ras activation and is associated with in vitro and in vivo cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 272, 22: 14057 – 14061

Ramstad, C, Sundvold, V, Johansen, HK, Lea, T. 2000.

MAPK/ERK pathway. *Cell Signal* 12, 8: 557 – 563

Ravichandran, KS, Lorenz, U, Shoelson, SE, and Burakoff, SJ. 1995.

Interaction of Shc with Grb2 regulates association of Grb2 with mSos. *Mol Cell Biol* 15, 2: 593 – 600

Ridley, AJ, Paterson, HF, Johnston, CL, Diekmann, D, and Hall, A. 1992.

The small GTP-binding protein Rac regulates Growth Factor – induced Membrane ruffling. *Cell* 70: 401 – 410

Rizzo, MA, Shorne, K, Walkins, SC and Romero, G. 2000.

The recruitment of Raf-1 to membrane is mediated by direct interaction with phosphatidic acid and is independent of association with Ras. *J Biol Chem* 275: 23911 - 23918

Rizzo, MA, Kraft, CA, Walkins, SC, Levitan, ES, and Romero, G. 2001.

Agonist-dependent traffic of raft-associated Ras and Raf-1 is required for activation of the mitogen-activated protein kinase cascade. *J Biol Chem* 276: 34928 - 34933

Rodriguez-Viciana, P, Warne, PH, Dhand, R, Vanhaesenbroeck, B, Gout, I, Fry, M, Waterfield, MD, and Downward, J. 1994.

Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. Nature 370: 527 – 532

Rodriguez-Viciana, P, Warne, PH, Vanhaesebroeck, B, Waterfield, MD, and Downward, J. 1996.

Activation of phosphoinositide 3-kinase by interaction with Ras and by point mutation. EMBO 15, 10: 2442 – 2451

Rodriguez-Viciana, P, Warne, PH, Khwaja, A, Marter, BM, Pappin, D, Das, P, Waterfield, MD, Ridley, A, Downward, J. 1997.

Role of Phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin Cytoskeleton by Ras. Cell 89: 457 – 467

Roy, S, Wyse, B, and Hancock, JF. 2002.

H-Ras Signaling and K-Ras Signaling are differentially dependent on Endocytosis. Mol Cell Biol 22: 5128 – 5140

Rubio, I, 1997.

Dissertation: Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Ras und Phosphoinositid 3-Kinase γ . Friedrich-Schiller-Universität Jena

Rubio, I, Rodriguez-Viciana, P, Downward, J, Wetzker, R. 1997b.

Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. Biochem J 326: 891 – 895

Rubio, I, Wittig, U, Meyer, C, Heinze, R, Kadereit, D, Waldmann, H, Downward, J, and Wetzker, R, 1999.

Farnesylation of Ras is important for the interaction with Phosphoinositide 3-kinase. Eur J Biochem 266: 70 – 82

Russell, M, Lange-Carter, CA, and Johnson, GL. 1995.

Direct interaction between Ras and the kinase domain of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase (MEKK1). J Biol Chem 270, 20: 11757 – 11760

Satoh, T, Nakafuku, M, Miyajima, A, and Kaziro, Y. 1991.

Involvement of ras p21 protein in signal transduction pathways from interleukin 2, interleukin 3, and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor, but not from interleukin 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8: 3314 – 3318

Schlessinger, J. 1993.

How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18, 8: 273-275

Schlichting, I, Almo, SC, Rapp, G, Wilson, K, Petratos, K, Lentfer, A, Wittinghofer, A, Kabsch, W, Pai, EF, Petsko, GA and Goody, RS. 1990.

Time-resolved x-ray crystallographic study of the conformational change in Ha-Ras p21 protein on GTP hydrolysis. *Nature* 345: 309 – 315

Settleman, J, Narasimhan, V, Foster, LC, Weinberg, R A. 1992.

Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell* 69, 3: 539-549

Siddiqui, AA, Garland, JR, Dalton, MB, and Sinensky, M. 1998.

Evidence for a high affinity, saturable, prenylation-dependent p21Ha-ras binding site in plasma membranes. *J Biol Chem* 273, 6: 3712 – 3717

Simons, K and Toomre, D. 2000.

Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1: 31 - 39

Smith, CC, Nelson, J, Aurelian, L, Gober, M, Goswami, BB. 2000.

Ras/MEK/MAPK mitogenic pathway are required for timely onset of virus growth. *J Virol* 74, 22: 10417 – 10429

Songyang, Z, Shoelson, SE, Chaudhuri, M, Gish, G, Pawson, T, Haser, WG, et al. 1993.

SH2 domains recognize specific Phosphopeptide sequences. *Cell* 72: 767 – 778

Sorkin, A, and Von Zastrow, M. 2002.

Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nature Rev Mol Cell Biol* 3: 600 -614

Spaargaren, M, Bischoff, JR. 1994.

Identification of the guanine nucleotide dissociation stimulator for Ral as a putative effector molecule of R-ras, H-ras, K-ras and Rap. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 26:12609-12613

Stephens, LR, Hughes, KT, Irvine, RF. 1991.

Pathway of Phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 351, 6321: 33-39

Stephens, LR, Jackson, TR, Hawkins, PT. 1993.

Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-triphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochem Biophys Acta* 1179: 27 – 75

Stephens, L, Smrcka, A, Cooke, FT, Jackson, TJ, Sternweis, P, and Hawkins, PT. 1994.

A novel Phosphoinositide 3 Kinase activity in Myeloid-Derived cells is activated by G Protein $\beta\gamma$ subunits. *Cell* 77: 83 – 93

Stephens, LR, Eguinoa, A, Erdjument-Bromage, H, Lui, M, Cooke, F, Coadwell, J, Smrcka, AS, Thelen, M, Cadwallader, K, Temst, P, and Hawkins, PT. 1997.

The $G\beta\gamma$ sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89: 105 – 115

Stokoe, D, MacDonald, SG, Cadwallader, K, Symans, M, Hancock, JF. 1994.

Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264: 1463 – 1467

Stoyanov, B, Volinia, S, Hanck, T, Rubio, I, Loubtchenkov, M, Malek, D, Stoyanova, S, Vanhaesebroeck, B, Dhand, R, Nürnberg, B, Gierschik, P, Seedorf, K, Hsuan, JJ, Waterfield, MD, Wetzker, R. 1995.

Cloning and characterization of a G protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269, 5224: 690 – 693

Takai, Y, Sasaki, T, Matozaki, T. 2001.

Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev* 81, 1: 153 - 208

Thorburn, J, McMahon, M, and Thorburn, A. 1994.

Raf-1 kinase activity is necessary and sufficient for gene expression changes but not sufficient for cellular morphology changes associated with cardiac myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269, 48: 30580 – 30586

Toker, A, Meyer, M, Reddy, UK, Talack, JR, Aneja, R, Aneja, S, et al. 1994.

Activation of Protein kinase C family members by the novel Polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P₂ and PtdIns-3,4,5-P₃. *J Biol Chem* 269, 51: 32358 – 32367

Torti, M, Marti, KB, Altschuler, D, Yamamoto, EG, and Lapetina, E. 1992.

Erythropoietin induces p21ras activation and p120GAP tyrosine phosphorylation in human erythroleukemia cells. *J Biol Chem* 267, 12: 8293 – 8298

Trahey, M, Wong, G, Halenbeck, R, Rubinfeld, B, Martin, GA, Ladner, M, Long, CM, Crosier, WJ, Watt, K, Kolhs, K, McCormick, F. 1988.

Molecular cloning of two types of GAP complementary DNA from human placenta. *Science* 242: 1697 – 1700

Urano, T, Emkey, R, Feig, LA. 1996.

Ras-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *EMBO* 15, 4: 810 – 816

Van Aelst, I, Barr, M, Marcus, S, Polverino, A, Wigler, M. 1993.

Complex formation between Ras and Raf and other protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 13: 6213 – 6217

Vanhaesebroeck, B, Leevers, SJ, Pantayotou, G, and Waterfield, MD. 1997.
Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. Trends
Biochem Sci 22, 7: 267 – 272

Vanhaesebroeck, B, et al. 2001.
Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. Annu Rev Biochem 70:
535 – 602

Vanhaesebroeck, B, Ali, K, Bilancio, A, Geering, B, Foukas, LC. 2005.
Signaling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. Trends Biochem Sci
30, 4: 194 - 204

Van Laethem, F, and Leo, O. 2002.
Membrane lipid rafts: new targets for immunoregulation. Curr Mo. Med 2, 557 - 570

Van Putten, V, Refaat, Z, Dessev, C, Blaine, S, Wick, M, Butterfield, L, Han, SY,
Heasley, LE, Nemenoff, RA. 2001.
Induction of cPLA2 by oncogenic Ras is mediated through the INK and ERK
pathways in rat epithelial cells. J Biol Chem 276, 2: 1226 - 1236

Virbasius, JV, Guilherme, A, and Czech, MP. 1996.
Mouse p170 is a novel Phosphatidylinositol 3-Kinase containing a C2 domain. J Biol
Chem 271, 23: 13304 – 13307

Volinia, S, Dhand, R, Vanhaesebroeck, B, MacDougall, U, Stein, R, Zvelebil,
M, et al. 1995.
A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-
Vps15p protein sorting system. EMBO 14: 3339 – 3348

Voigt, P, Brock, C, Nürnberg, B, Schaefer, M. 2005.
Assigning functional Domains within the p101 Regulatory Subunit of
Phosphoinositide 3-Kinase. J Biol Chem 280, 6: 5121 -5127

Watanabe, T, Muto, T. 2000.

Colorectal carcinogenesis based on molecular biology of nonpolypoid (superficial) lesions. World J Surg 24, 9: 1091 – 1097

Watton, SJ, Downward, J. 1999.

Akt/PKB localisation and 3'phosphoinositide generation at sites of epithelial cell-matrix and cell-cell interaction. Current Biology 9, 8: 433 - 436

Wei, S, Gilvary, DL, Corliss, BC, Sebt, S, Sun, J, Strauss, DB, Leibson, PJ, Trapani, JA, Hamilton, AD, Weber, MJ, Djeu, Jy. 2000.

Mitogen-activated protein kinase signal pathway. J Immunol. 165, 7: 3811-9

Wennström, SHP, Cocke, F, Hara, K, Yonezawa, K, Kasuga, M, Jackson, T, Claesson-Welsh, L, and Stephens, L. 1994.

Activation of Phosphoinositide 3-kinase is required for PDGF-stimulated membrane ruffling. Curr Biol 4, 5: 385 – 393

Wennström, S, Downward, J. 1999.

Role of phosphoinositide 3-kinase in activation of Ras and Mitogen-activated Protein Kinase by epidermal growth factor. Molecular and Cell Biology 19, 6: 4279 - 88

White, MA, Nicolette, C, Minden, A, Polverino, A, van Aelst, A, Karin, M, and Wigler, MH. 1995.

Multiple Ras functions can contribute to mammalian cell transformation. Cell 80: 533 – 441

Williams, N, G, Roberts, TM, Li, P. 1992.

Both p21ras and pp60v-src are required, but neither alone is sufficient to activate the Raf-1 kinase. Proc Natl Acad Sci USA 89, 7: 2922 – 2926

Wittinghofer, A and Herrmann, C. 1995.

Ras-effector interactions, the problem of specificity. FEBS Lett. 369: 52 – 56

Wittinghofer, A und Nicolas Nassar. 1996.

How Ras-related proteins talk to their effectors. TIBS 21, 12: 488 – 491

Wymann, MP. 1998.

PI3Kgamma to the protein kinases PKB and MAPK. Science 282: 293-6

Yamagata, K, Sanders, LK, Kaufmann, WE, Yee, W, Barnes, CA, Nathans, D, and Worley, PF. 1994.

Rheb, a growth factor- and synaptic activity-regulated gene, encodes a novel ras-related protein. J Biol Chem 269, 23: 16333 – 16339

Zhang, BH, Guan, KL. 2000.

Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. EMBO J 19, 20: 5429 – 5439

Zhang, S, Broxmeyer, HE. 2000.

Fit3 Ligand induces tyrosine phosphorylation of Gab1 and kinase. Biochem Biophys Res Commun. 277, 1: 15 – 199

Zieger, M, Oehrl, W, Wetzker, R, Henklein, P, Nowak, G, Kaufmann, R. 2000.

Different signaling pathways are involved in CCK_B receptor-mediated MAP Kinase activation in COS7-cells. Biological Chemistry 381, 8: 763 – 768

9 Anhang

Curriculum vitae

Name: Claudia Borgholte (geb. Mayer)

geboren: 8. Oktober 1973 in Winnenden

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1980 – 1984:
Grundschule Schelmenholz

1984 – 1993:
Lessing Gymnasium Winnenden

Medizinstudium: Oktober 1993 – April 1999:
Medizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

April 1999 – Mai 2000:
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg:
Praktisches Jahr im Klinikum Ludwigsburg mit Wahlfach
Gynäkologie

Beruflicher Werdegang: Juni 2000 – November 2001:
AiP in der Allgemein- und Viszeralchirurgie Klinikum
Ludwigsburg GmbH in Ludwigsburg

Dezember 2001 – Juni 2005
Assistenzärztin in der Weiterbildung zum Facharzt
Chirurgie in der Allgemein- und Viszeralchirurgie
Klinikum Ludwigsburg

15. August 2002 – 15. Februar 2003
Klinik für Gefäßchirurgie im Rahmen der
Facharztweiterbildung Chirurgie

22. März.2004 – 28. Februar 2005
Elternzeit

Seit Juli 2005
Assistenzärztin in der Weiterbildung zum Facharzt
Chirurgie in der Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
Krankenhaus Bietigheim

- Publikationen:
- Cardiomyopathy of Pregnancy at 22 Weeks Gestation:
A case report.
I. Tekesin, S. Heller, C. Mayer, R. Berroth, G. Liebau,
V. Voudouri
Geburtshilfe und Frauenheilkunde, 2000, Vol. 60, Part 7,
388 – 391
- Farnesylation of Ras is important for the interaction with
Phosphoinositide 3-kinase γ
Ignacio Rubio, Ute Wittig, Claudia Mayer, Regina Heinze,
Dieter Kadereit, Herbert Waldmann, Julian Downward
and Reinhard Wetzker
Eur. J. Biochem. 266, 1999, 70 - 82

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist.

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. I. Rubio, Prof. R. Wetzker,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder mittelbar noch unmittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleich, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Marbach, den 16.12.05

Claudia Borgholte

Danksagungen

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. R. Wetzker für die Möglichkeit in der Max-Planck-Gruppe „Molekulare Zellbiologie“ arbeiten und promovieren zu dürfen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. I. Rubio für seine intensive Betreuung während der experimentellen Durchführung und seine fortwährende Unterstützung bedanken.

Frau H. Keilhack und allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für ihre stetige Bereitschaft zur Überwindung technischer Probleme danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mit liebevoller Anteilnahme meinen Lebensweg begleiteten. Meinem Bruder, der stets mit Rat an meiner Seite war. Meinem Mann, der mich in jeder Hinsicht unterstützt, der mir besonders bei computertechnischen Problemen eine große Hilfe war. Danke, dass Du immer für mich da warst und bist.

Und meiner Tochter, durch die diese Arbeit ihr Ende gefunden hat.